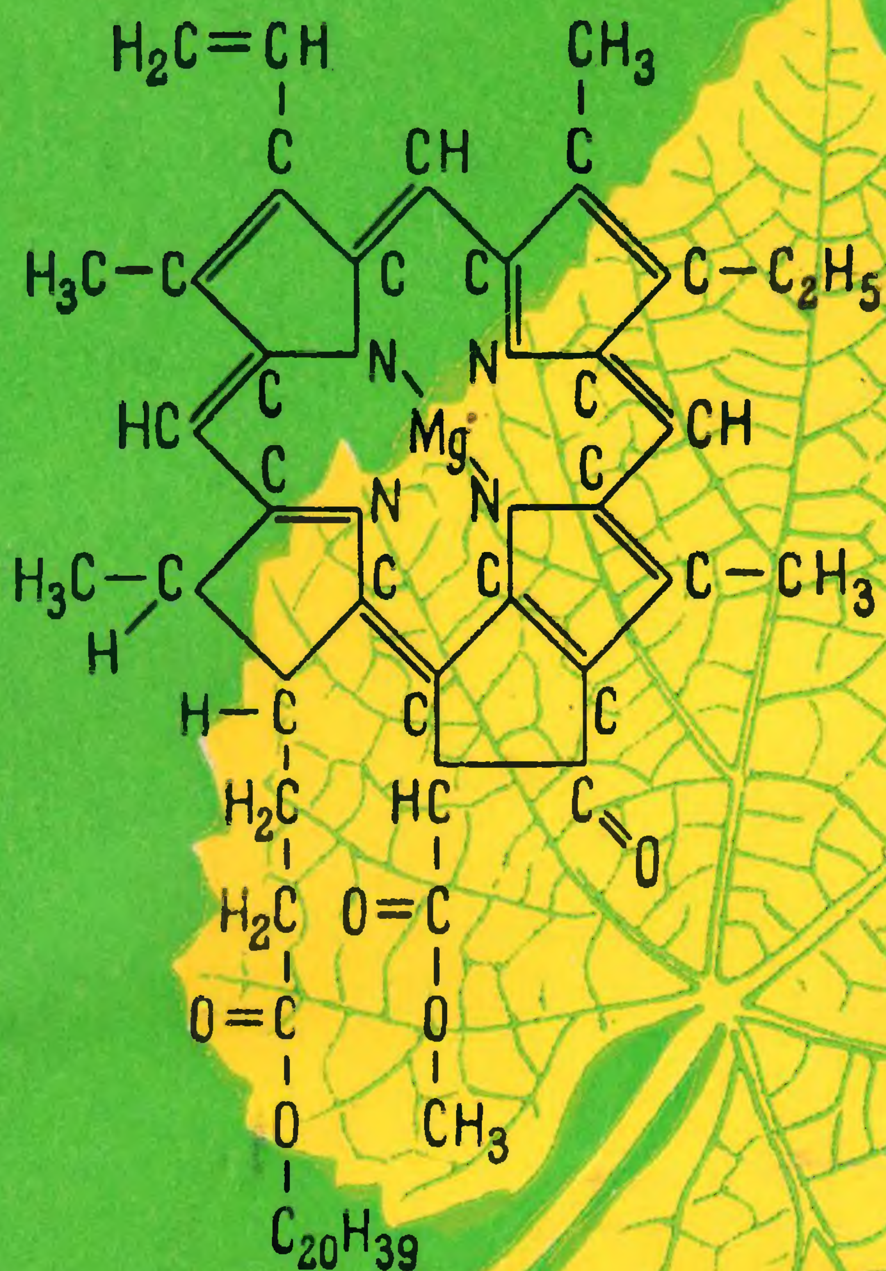
VISIT…

LANZAROTE

Caliente.com

АКАДЕМИЯ НАУК СССР



ПИГМЕНТЫ ПЛАСТИД ЗЕЛЕНЫХ РАСТЕНИЙ

И МЕТОДИКА ИХ ИССЛЕДОВАНИЯ

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
БОТАНИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ им. В. Л. КОМАРОВА

ПИГМЕНТЫ ПЛАСТИД ЗЕЛЕНЫХ РАСТЕНИЙ И МЕТОДИКА ИХ ИССЛЕДОВАНИЯ

ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА»
МОСКВА—ЛЕНИНГРАД
1964

Коллектив авторов:

Н. В. Бажанова, Т. Г. Маслова, И. А. Попова, О. Ф. Попова, Д. И. Сапожников, З. М. Эйдельман при участии *С. М. Черноморского* и *И. М. Меницкой*

Ответственный редактор

Д. И. Сапожников

АННОТАЦИЯ

Книга представляет собой коллективный труд группы сотрудников Лаборатории фотосинтеза Ботанического института им. В. Л. Комарова АН СССР.

Упор при изложении сделан на методическую часть, причем в основном изложены лишь те методики, которые были разработаны в указанной лаборатории или модифицированы применительно к имеющимся в ней условиям.

Содержание книги складывается из двух частей — теоретической и методической. В теоретической части излагаются понятие пигментов пластид и значение их исследования, приводятся их классификация, строение, свойства и распространение, освещаются вопросы биосинтеза пигментов пластид.

Методическая часть содержит два раздела: общие приемы исследования и описание отдельных методик.

Приложение содержит сведения о растворителях, адсорбентах, буферных растворах и т. п.

Книга рассчитана на биохимиков и физиологов растений — научных работников, аспирантов и студентов старших курсов.

ГЛАВА I

ПИГМЕНТЫ ПЛАСТИД И ЗНАЧЕНИЕ ИХ ИССЛЕДОВАНИЯ

ПОНЯТИЕ «ПИГМЕНТ»

Словом «пигменты» обозначаются всевозможные вещества, имеющие ту или иную окраску. Более узкое, техническое значение имеет слово «краситель». Красителями называют пигменты, применяемые в крашении благодаря их способности фиксироваться на волокнах как растительного (хлопок, лен), так и животного (шерсть, шелк) происхождения.

Пигменты по их химическому составу можно подразделить на неорганические и органические. Неорганические пигменты — это высокодисперсные окислы или соли поливалентных металлов, обычно нерастворимые в воде и обладающие определенным цветом. Неорганические пигменты применяются для изготовления масляных красок, лаков и т. п. Пигменты, имеющие органическую природу, по их происхождению можно разделить на синтетические и природные.

Синтетические пигменты получают главным образом из ароматических соединений каменноугольного дегтя. Важнейшими из них являются азокрасители, антрахиноновые, индигоидные и многие другие.

Число природных пигментов, синтезируемых живыми организмами, чрезвычайно велико. Ими обусловлено то бесконечное многообразие цветов и оттенков, которыми изобилует окружающий нас животный и растительный мир.

ПОНЯТИЕ «ХРОМОФОРНАЯ ГРУППА»

Ощущение окраски объясняется действием электромагнитных колебаний определенной частоты на зрительные рецепторы животных. Видимая человеческим глазом часть электромагнитного спектра лежит в пределах колебаний с длиной волны 4000—8000 Å. Те органические соединения, которые поглощают колебания с длиной волны меньше 4000 Å, кажутся нам бесцветными.

Поглощение света, как известно, связано с колебательным движением электронов в молекуле, совершающимся при воздействии на данное вещество лучей определенной длины волны. Прочно связанные электроны поглощают лучи с короткими длинами волн, обладающих высокой частотой колебаний. Увеличение подвижности электронов в молекуле, которое связано с увеличением числа конъюгированных двойных связей, приводит к повышению способности электронов приходить в колебание под действием квантов меньшей энергии, т. е. лучей света с большей длиной волны. Вследствие этого такие вещества становятся видимыми. Простые по строению ненасыщенные соединения поглощают обычно свет в ограниченной и узкой части спектра; про такие вещества говорят, что они обладают одной полосой поглощения с максимальной интенсивностью при определенной длине волны.

Соединения, имеющие несколько центров ненасыщенности в молекуле, дают комплексный спектр поглощения, состоящий из нескольких полос; в иных случаях такие соединения могут поглощать свет в пределах широкой области спектра и давать одну широкую полосу или ряд неравномерных максимумов.

Если вещество поглощает все видимые лучи света, за исключением какой-либо части, например фиолетовой части спектра, то оно будет пропускать только фиолетовые лучи и будет поэтому обладать именно этим цветом. Ощущение фиолетового цвета можно получить и в том случае, если соединение поглощает желто-зеленые лучи, являющиеся дополнительными к фиолетовым.

Приведем видимые цвета пигментов в зависимости от поглощенных ими длин волн:

Поглощенные лучи		Видимый цвет пигмента
длина волны, ммк	соответствующий цвет	
400	Фиолетовый	Желто-зеленый
425	Индиго-синий	Желтый
450	Синий	Оранжевый
490	Синевато-зеленый	Красный
510	Зеленый	Пурпурный
530	Желто-зеленый	Фиолетовый
550	Желтый	Индиго-синий
590	Оранжевый	Синий
640	Красный	Синевато-желтый
730	Пурпурный	Зеленый

При смещении полос поглощения органических соединений в сторону длинноволновой части спектра происходит «углубление» цвета, зависящее от характера той атомной группировки, которая обусловливает возникновение центра ненасыщенности. Сказанное хорошо иллюстрирует табл. 1, в которой приведены четыре соединения, обладающие довольно простым спектром поглощения и построенные из двух фенильных групп, соединенных различными группировками атомов.

Таблица 1

Влияние различных центров ненасыщенности на максимум поглощения

Соединение	Формула	Максимум поглощения (Å)	Цвет
Стильбен	$C_6H_5-CH{=}CH-C_6H_5$	2950	Бесцветен
Бензальанилин	$C_6H_5-CH{=}N-C_6H_5$	3300	»
Азобензол	$C_6H_5-N{=}N-C_6H_5$	4500	Оранжевый
Тиобензофенон	$C_6H_5-\underset{\underset{S}{\|}}{C}-C_6H_5$	6200	Синий

Подвижность электронов возрастает в ряду центров ненасыщенности в следующем порядке: $-CH{=}CH-$; $-CH{=}N-$; $-N{=}N-$; $>C{=}S$.

В более сложных соединениях цвет является результатом поглощения света в различных частях спектра. Так, например, тело может обладать зеленым цветом вследствие поглощения пурпурной части спектра, но зеленым будет казаться также и тело, поглощающее в областях, дополнительных к синему и желтому цветам.

Для групп атомов, являющихся основной причиной окраски данного тела, было введено понятие «хромофоры». Все эти группы характеризуются наличием двойной связи, т. е. центром ненасыщенности:

$-N{=}N-$ (азо-); $-\underset{\underset{O}{\|}}{\overset{+}{N}}-\bar{O}$ (нитро-); $-\underset{\underset{O}{\|}}{N}{=}N-$ (азокси-); $-N{=}O$ (нитрозо-); $>C{=}O$ (карбонил-); $>C{=}C<$ (этенил-); $>C{=}S$ (тио-).

Не всегда бывает достаточно наличия одной хромофорной группы для того, чтобы тело приобрело окраску. Так, например, ацетон ($CH_3-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-CH_3$) бесцветен, но уже диацетил ($CH_3-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-CH_3$) имеет желтый цвет, а трикарбонил-пентан ($CH_3-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-CH_3$) обладает желто-оранжевой окраской.

Влияние, оказываемое на цвет соединения увеличением числа хромофорных групп, можно видеть на примерах дифенил-полиенов и полипиррольных соединений, близких по составу к каротиноидам и хлорофиллам — пигментам пластид.

Дифенил-полиены имеют общую формулу $C_6H_5(CH{=}CH)_nC_6H_5$, где n — число этениловых групп. В табл. 2 приведены свойства этих соединений в зависимости от числа этениловых групп.

Таблица 2

Некоторые оптические свойства дифенил-полиенов

Значение n	Цвет	Максимумы поглощения, ммк		
1	Бесцветен .	319	306	294
2	» .	352	334	316
3	Светло-желтый . .	377	358	343
4	Зеленовато-желтый	404	364	383
5	Оранжевый . . .	424	403	387
6	Коричневато-оранжевый	445	420	400
7	Бронзово-медный	465	435	413
11	Фиолетово-черный	530	493	462
15	Зеленовато-черный	570	532	—

Из табл. 2 видно, что с увеличением числа хромофорных групп происходит «углубление» окраски соединения.

В качестве другого примера зависимости окраски от системы хромофорных групп можно привести порфиновые структуры (рис. 1).

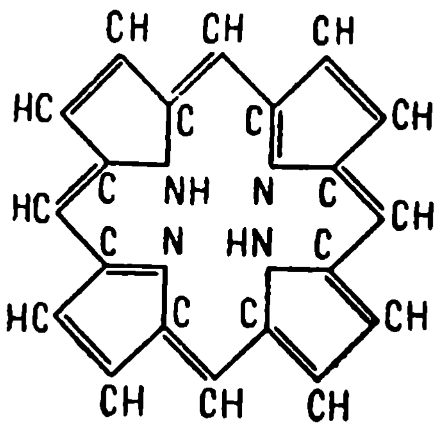


Рис. 1. Структурная формула порфина.

В основе порфиновой структуры лежит гетероциклический пиррол. Несмотря на наличие в пирроле двух двойных связей, он бесцветен. Система двойных связей порфина, которую можно рассматривать как одну хромофорную группу, дает сильные полосы поглощения в близком ультрафиолете и в видимой части спектра. Рассматривая поглощение порфина в видимом свете, можно видеть типичную картину четырех полос поглощения.

Гидрирование одного из пиррольных ядер порфина, т. е. переход от системы порфина к системе хлорина и родина, вызывает поглощение в красной и сине-фиолетовой части и ослабление поглощения в желто-зеленой части спектра. Дальнейшее гидрирование еще одного пиррольного кольца с образованием тетрагидропорфина приводит к еще большему изменению спектра. Соединения такого типа имеют полосу поглощения с наибольшей интенсивностью в инфракрасной области.

ПОНЯТИЕ «ПЛАСТИДА»

Среди клеточных структур имеются обособленные зернистые образования — пластиды (хроматофоры, хлоропласты, хромопласты), обладающие общим характерным свойством — они все являются носителями и местом синтеза пигментов.

Уже у фотосинтезирующих бактерий — сернопурпурных и сернозеленых — пигмент оказывается сосредоточенным в хроматофорах. До последних лет считалось, что пигменты у этих бактерий рассеяны диффузно по всей клетке.

У синезеленых водорослей равным образом долгое время не были обнаружены хроматофоры; новейшими исследованиями с помощью более совершенных методов было показано, что и у них пигменты концентрируются в хроматофорах.

У зеленых водорослей структура хроматофоров отличается большим разнообразием и часто весьма сложна; это обстоятельство используется ботаниками для целей систематики.

У высших водорослей и у высших зеленых растений в процессе эволюции произошло известное упрощение формы хлоропласта; пластиды приобрели форму дисков и стали универсальным аппаратом фотосинтеза.

Существование пластид у всех фототрофных организмов безусловно говорит в пользу того, что они являются теми органеллами, в которых совершается превращение поглощенной световой энергии в потенциальную химическую энергию синтезируемых органических веществ.

С помощью современных методов микроскопирования (ультрамикроскоп, фазовоконтрастный микроскоп, электронный микроскоп) и ультрацентрифугирования удалось довольно детально изучить структуру пластиды. Она оказалась построенной из липопротеидных пластинчатых образований — ламелл; уплотненные части ламелл образуют так называемые граны, а части ламелл, расположенные между гранами, образуют структуры — квантазомы. Граны и ламеллы могут быть разделены путем фракционного центрифугирования после предварительного озвучивания хлоропластов. Граны отделяются центрифугированием при 45 000 g, а квантазомы — при 145 000 g. Граны имеют форму дисков размером около 1 мк, а квантазомы — форму эллипсоида с длинной осью, равной 200 Å, и короткой осью, равной 100 Å.

Таким образом, исследование пигментов пластид охватывает вполне строго отграниченный круг вопросов, относящихся к изучению строения, свойств и анализа соединений, содержащих хромофорные группы и приуроченных к специальным клеточным структурам — пластидам. Значение исследования пигментов пластид обусловлено той ролью, которую они играют в жизни растений и животных.

Пигменты пластид участвуют в процессе фотосинтеза, но этим не исчерпываются их роль в жизни растений. Как известно, пигменты пластид в известной мере участвуют в процессах роста и развития. Так, например, проростки, выросшие в темноте — этиолированные — имеют бо́льшую длину, чем выросшие на свету. Это явление имеет большое биологическое значение и может быть объяснено теми регулирующими рост процессами, которые зависят от присутствия хлорофилла.

За последние годы было показано, что пигменты пластид играют определенную роль и в процессах развития. Так, процессы фотопериодизма, с которыми связано прохождение растениями световой стадии, оказались зависящими от пигментно-белкового комплекса, имеющего поглощение как в красном, так и в ближнем инфракрасном свете.

В жизни животных пигменты имеют значение как провитамины, а также служат фоторецепторами в зрительном акте. Так, хлорофилл можно считать провитамином K, а каротин — провитамином A. Некоторые ксантофиллы участвуют в реакциях, проходящих при зрительном акте.

Все вышеизложенное делает понятным значение исследования пигментов пластид для науки и практики.

КЛАССИФИКАЦИЯ ПИГМЕНТОВ ПЛАСТИД

До сих пор отсутствует общепринятая классификация пигментов пластид. Обычно их подразделяют на хлорофиллы и каротиноиды. Часто в литературе можно встретить деление на зеленые и желтые пигменты. При таком подразделении из поля зрения могут ускользнуть пигменты бурых и красных водорослей — фикобиллины (фикоэритрин и фикоцианин) и флоридорубин.

Мы предлагаем схему классификации, в основу которой положено химическое строение пигментов.

Все пигменты пластид подразделяются на азотсодержащие и безазотистые. Азотсодержащие пигменты охватывают все те соединения, в молекулу которых входит пиррольное кольцо, а к безазотистым относятся пигменты с полиеновой структурой.

Азотсодержащие подразделяются на пигменты, в молекулу которых входит магний в виде комплекса, и на не содержащие металла соединения.

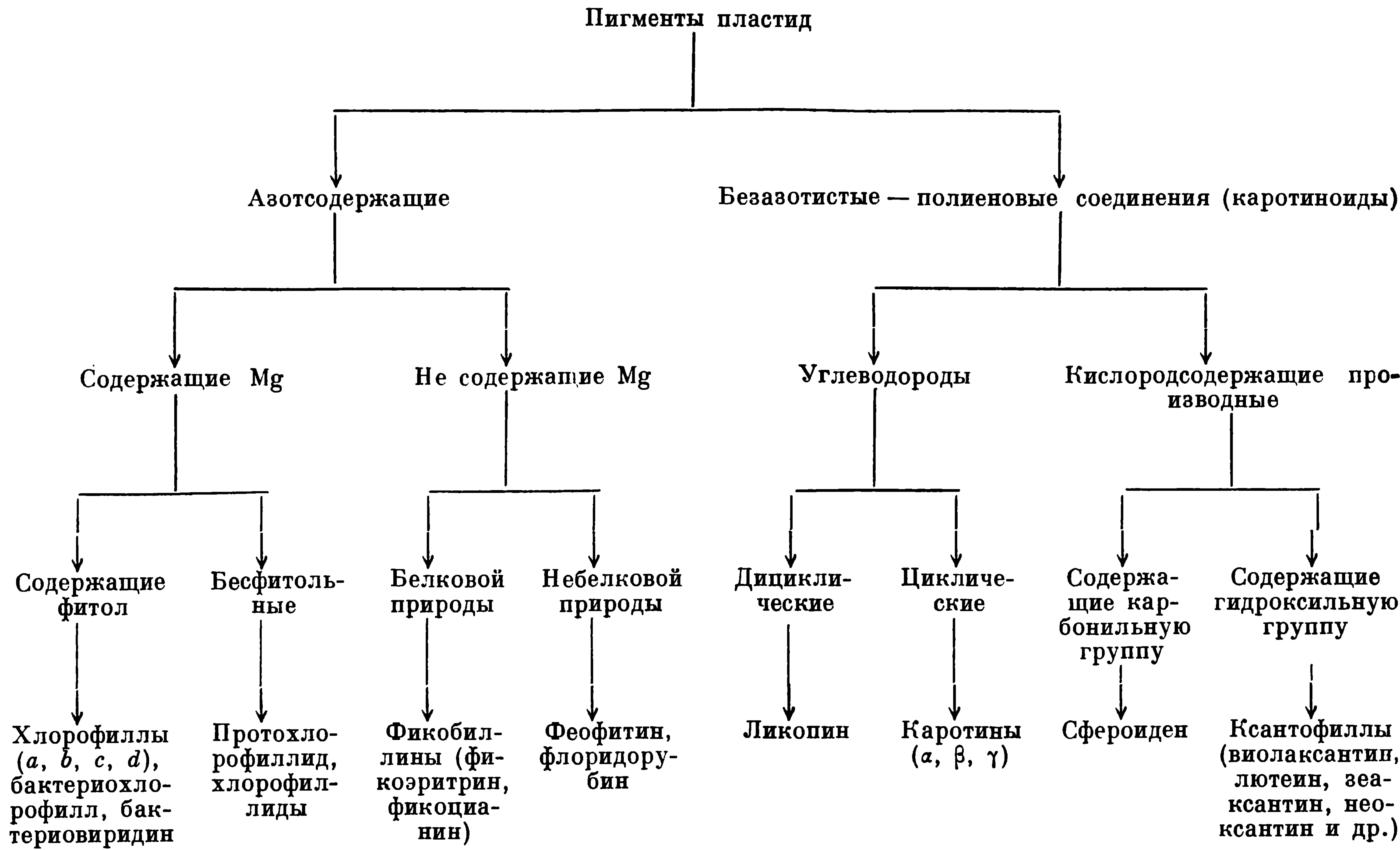
К содержащим комплексно связанный магний пиррольным соединениям относятся хлорофиллы *a*, *b*, *c* и *d*, бактериохлорофилл, бактериовиридин, протохлорофиллид, хлорофиллиды. В свою очередь содержащие магний пигменты подразделяются на фитольные и бесфитольные. Группа не содержащих магния пиррольных пигментов состоит из имеющих белковую природу соединений и соединений небелковой природы. К белковым относятся фикоэритрин и фикоцианин, к небелковым — феофитин и флоридорубин.

Безазотистые пигменты можно подразделить на углеводороды и кислородсодержащие производные.

Пигменты, имеющие строение углеводородов, делятся на соединения с открытой цепью и циклические. Примером ациклического углеводорода может служить ликопин; циклическими углеводородами являются каротины. Кислородсодержащие производные делятся в зависимости от характера кислородной группировки на гидрокси-, эпокси- и (оксо-)кетопроизводные. Гидрокси- и эпоксипроизводные получили название «ксантофиллов». Основными ксантофиллами листьев являются лютеин, виолаксантин, неоксантин и зеаксантин.

Все вышеизложенное можно представить в виде схемы.

СХЕМА КЛАССИФИКАЦИИ ПИГМЕНТОВ ПЛАСТИД



ГЛАВА III

СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА ПИГМЕНТОВ ПЛАСТИД

СТРОЕНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ ПИГМЕНТОВ

Хлорофиллы

Исследование хлорофилла имеет полуторавековую историю. В настоящее время не только изучено строение хлорофиллов, но также осуществлен полный химический синтез молекул как хлорофилла *a*, так и хлорофилла *b*. Основываясь на наших современных познаниях, можно считать доказанным, что хлорофилл *a* имеет нижеприведенную структурную формулу (рис. 2).

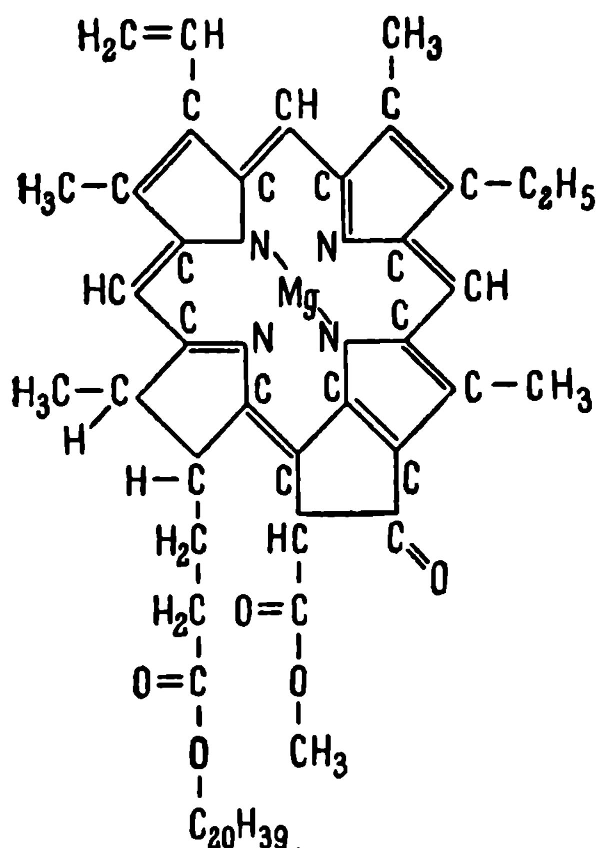


Рис. 2. Структурная формула хлорофилла *a*.

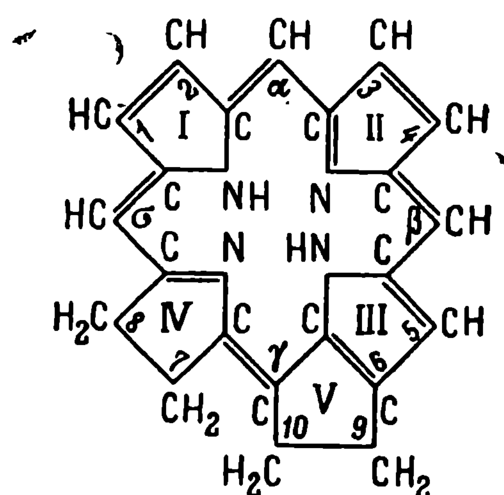


Рис. 3. Скелет форбина.

В молекуле хлорофилла *b* метильная группа во втором пиррольном кольце замещена на метоксильную группу.

Для облегчения рассмотрения формулы хлорофилла уместно здесь разобрать принцип ее построения. Основу молекулы хлорофилла составляет порфириновая структура. Порфиринами называют соединения, получающиеся из порфина (рис. 1) при замещении водородных атомов радикалами (метил-, этил-, пропил-).

Как известно, именно такая структура лежит в основе строения гема, являющегося комплексным железным производным порфирина. В отличие от гема хлорофилл имеет более сложную структуру, так как те порфирины, которые лежат в основе хлорофилла, имеют, кроме четырех гетероциклов, еще пятую изоциклическую группировку — циклопентан. Порфирины, содержащие кольцо пентана, называются форбинами (рис. 3).

Пиррольные кольца форбина нумеруются римскими цифрами I, II, III, IV, а связывающие их метиновые мостики помечаются греческими буквами α, β, γ, δ. Пятичленный изоцикл помечается римской цифрой V. Свободные (наружные) атомы форбинового кольца помечаются арабскими цифрами по часовой стрелке.



Рис. 4. Схема превращений хлорофилла и его производных.

Сравнивая скелет форбина со скелетом порфина, можно видеть, что у первого нет двойной связи между 7-м и 8-м атомами углерода; гидрирование двойной связи в этом междуатомном промежутке приводит к образованию производных типа хлоринов или родинов.

По женевской номенклатуре хлорофилл *a* имеет следующее название: «комплексная магниевая соль 1,3,5,8-тетра-метил-4-этил-2-винил-9-оксо-10-карбметокси-форбин-7-фитиловый эфир пропионовой кислоты». Так как хлорофилл *b* у третьего атома углерода вместо метильной группы содержит формильную, то по женевской номенклатуре его следует называть «комплексная магниевая соль 1,5,8-триметил-4-этил-2-винил-3-формил-10-карбметокси-форбин-7-фитиловый эфир пропионовой кислоты».

Ниже представлено соотношение между строением хлорофилла и его производных с их названиями в зависимости от потери того или иного атома или групп атомов.

Производные хлорофилла	Магний	Фитол	Циклопентан	Гидрированная двойная связь между 7-м и 8-м атомами
Филлин	+	+	+	+
Фитин	—	+	+	+
Форбин	—	—	+	+
Хлорин	—	—	—	+
Порфин	—	—	—	—

Для обозначения отдельных производных пользуются различными приставками. Так, например, приставкой *мезо-* обозначают соединения, в которых вместо винильной группы в I ядре пиррола содержится этильная группа; приставка *фео-* означает производные, лишенные магния, — феофитин, феофорбид и т. п.

В приводимой схеме видны взаимоотношения между хлорофиллом и его производными (рис. 4). Под действием кислоты в молекуле хлорофилла происходит замещение атома магния двумя атомами водорода с образованием молекулы феофитина (рис. 5).

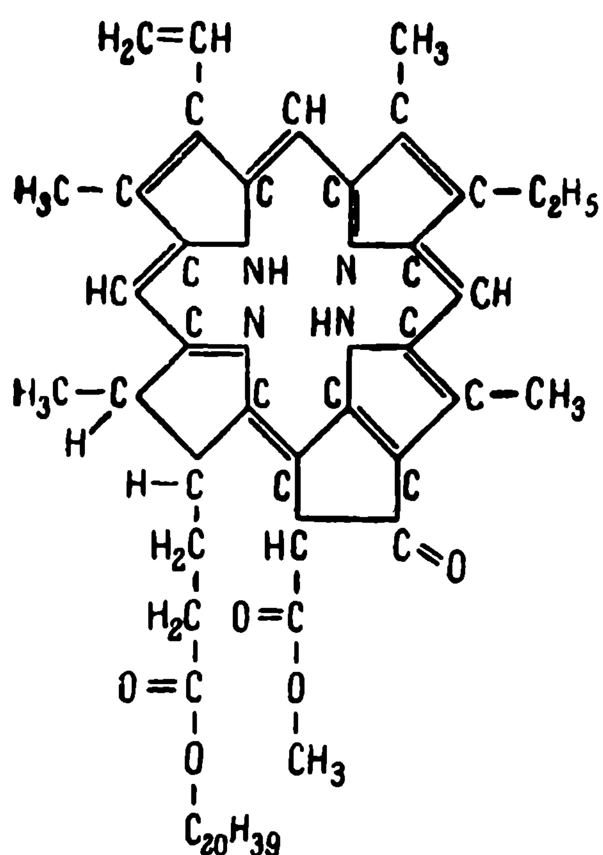


Рис. 5. Структурная формула феофитина.

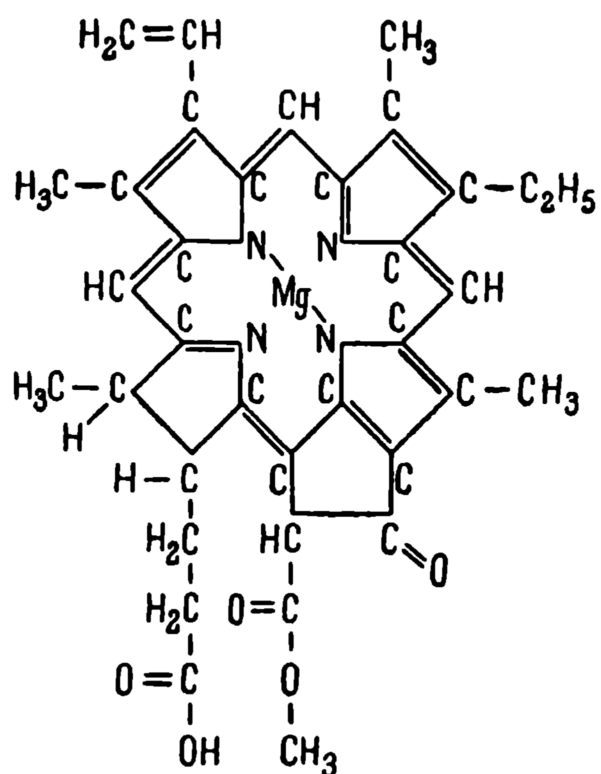


Рис. 6. Структурная формула хлорофиллида.

Реакция феофитинизации происходит даже под действием очень слабых кислот.

Отщепление фитола от хлорофилла приводит к образованию хлорофиллида (рис. 6).

Отщепление фитола от феофитина приводит к образованию феофорбида (рис. 7).

Все эти соединения характеризуются наличием циклопентанного кольца и поэтому являются еще форбинами.

При действии же щелочей на холоду магний из хлорофилла не отщепляется, но происходит разрыв изоцикла с образованием соединений ряда хлорина (для производных хлорофилла *a*) и ряда родина (для производных хлорофилла *b*). Отдельные хлорины и родины обозначаются индексами, состоящими из буквы латинского алфавита и цифры, обозначающей число атомов кислорода в молекуле (например, хлорин e_6).

Молекула протохлорофилла — пигмента, образующегося

в этиолированных проростках покрытосеменных растений, — отличается от хлорофилла наличием двойной связи между 7-м и 8-м атомами углерода (рис. 8).

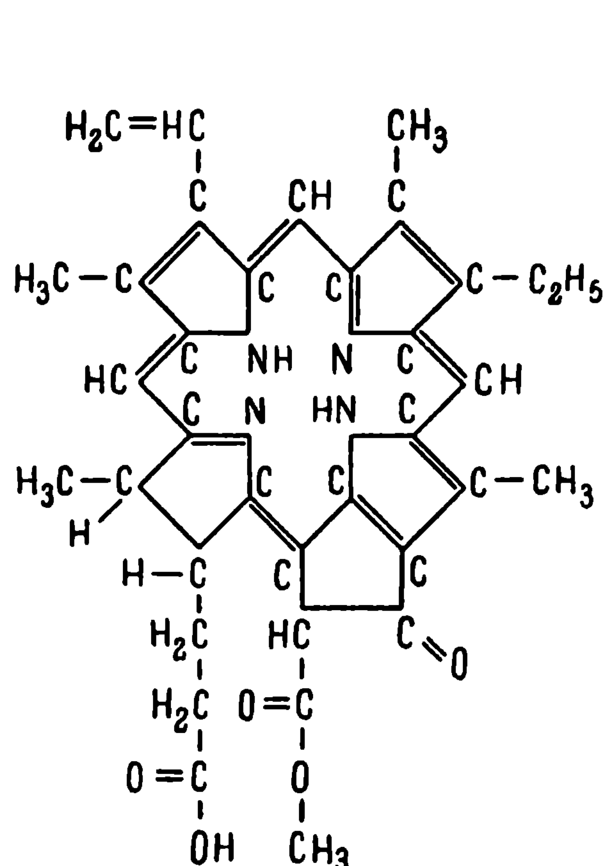


Рис. 7. Структурная формула феофорбида.

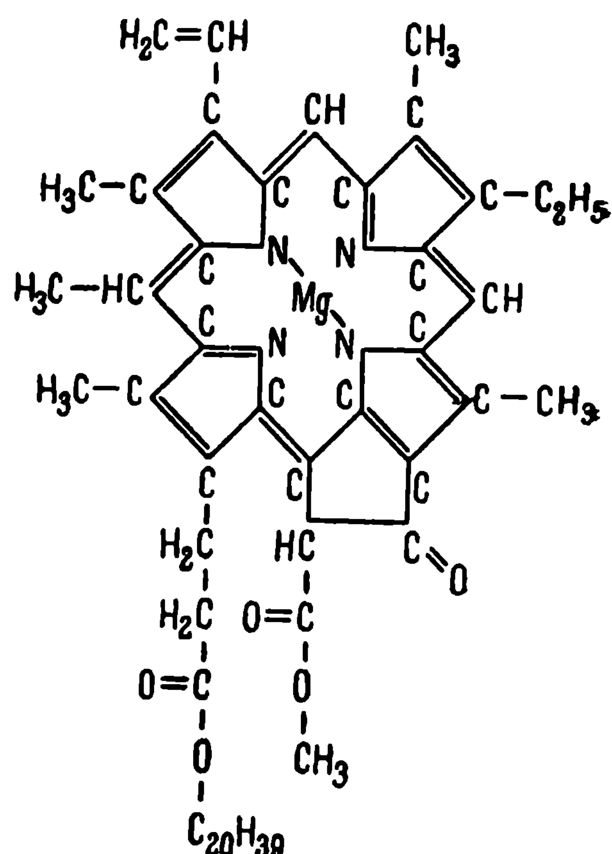


Рис. 8. Структурная формула протохлорофилла.

Каротиноиды

Исследование строения каротиноидов явилось триумфом метода хроматографической адсорбции. Только благодаря этому методу удалось выделить из смеси каротиноидов различные соединения и их изомеры.

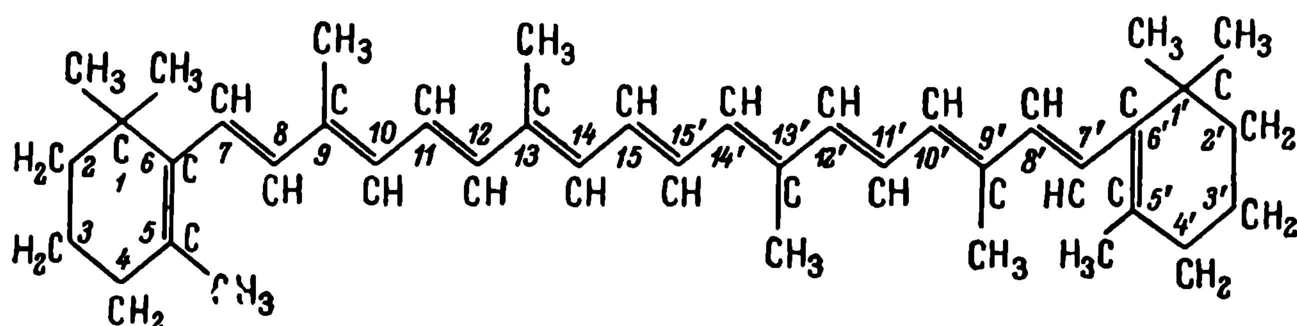


Рис. 9. Структурная формула β-каротина.

Международный химический съезд следующим образом определил каротиноиды: каротиноиды — это желтые или красные пигменты алифатического или алициклического строения, построенные из изопреновых остатков (обычно из восьми), соединенных таким образом, что две ближайшие к центру молекулы метильные группы находятся в положении 1 6, тогда как все другие боковые метильные группы стоят в положениях 1 : 5; серии конъюгированных двойных связей составляют хромофорную систему каротиноидов.

Характерным представителем каротиноидов является β-каротин (рис. 9).

Как видно из структурной формулы β-каротина, в его молекуле содержится 11 двойных связей, две из которых входят в кольца β-ионона. Так как в молекуле β-каротина оба иононовых кольца являются β-изомерами, то его строение вполне симметрично. Углеродные атомы молекулы β-каротина занумерованы так, как это показано на рис. 9.

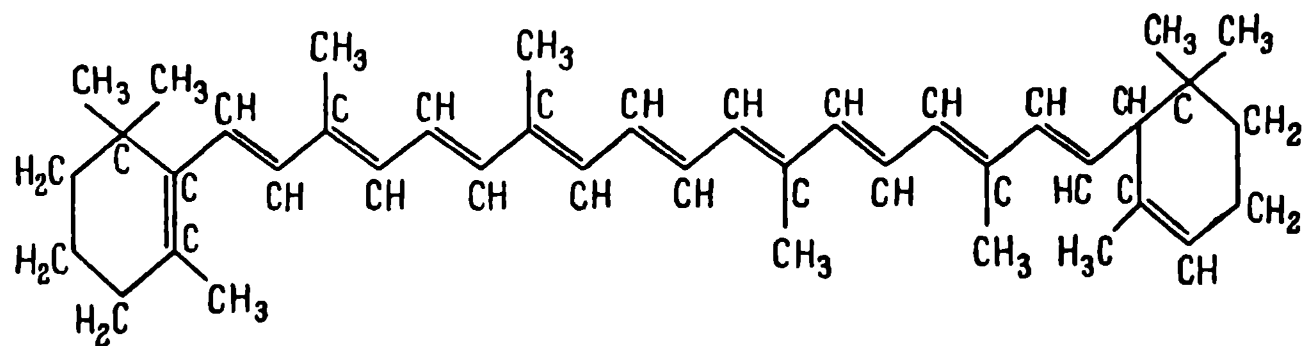


Рис. 10. Структурная формула α-каротина.

Изомером β-каротина является α-каротин. Он отличается присутствием в молекуле одного β-иононового и одного α-иононового кольца (рис. 10).

Как видно из структурной формулы α-каротина, молекула его асимметрична; в случае асимметричной молекулы каротиноида цифрами без штрихов обозначаются атомы той половины молекулы, в которой содержится β-иононовый остаток. α-Каротин отличается от β-каротина положением двойной связи: она

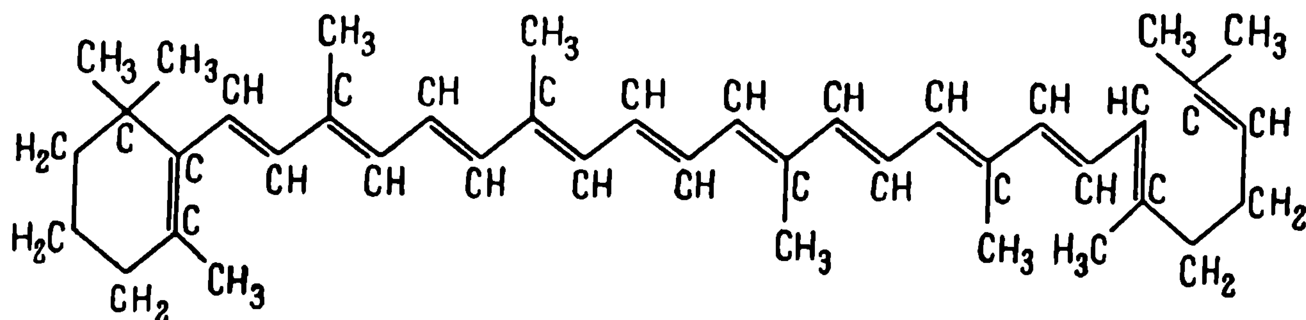


Рис. 11. Структурная формула γ-каротина.

находится в междуатомном промежутке 4′—5′, а не в промежутке 5′—6′

Третьим изомером является γ-каротин. Этот пигмент имеет лишь одно кольцо — β-иононовое, а второе кольцо отсутствует, вместо него имеется группировка псевдоионона (рис. 11).

Наконец, ликопин имеет ту же эмпирическую формулу, что и каротины, но относится к соединениям с открытой цепью (рис. 12).

Преобладающим в количественном отношении ксантофиллом пластид зеленых растений является лютеин. Здесь следует заметить, что в американской литературе часто ставится знак равенства между терминами «ксантофилл» и «лютеин». Словом

«ксантофилл» обозначают при этом один индивидуальный пигмент лютеин. Во избежание путаницы в терминологии в нашей книге слово «ксантофилл» имеет общее значение, характеризуя все гидрокси- и эпоксипроизводные каротиноидов.

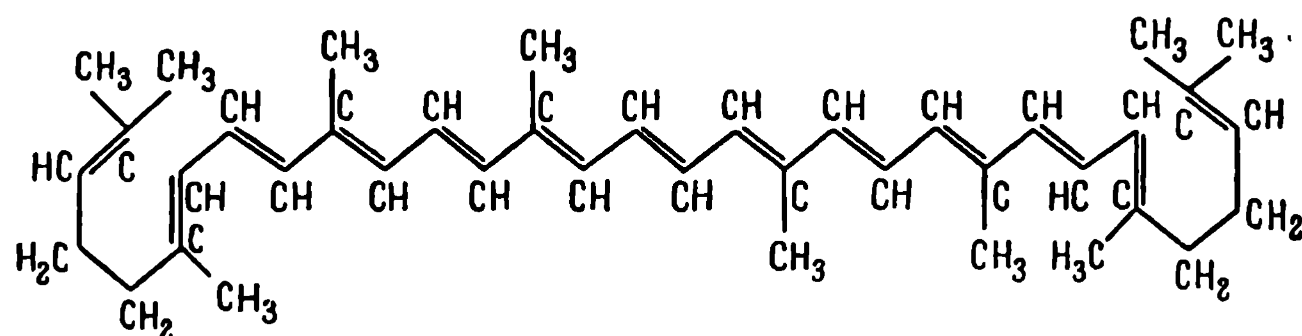


Рис. 12. Структурная формула ликопина.

Лютеин является по своей структуре 3,3′-дигидрокси-α-каротином (рис. 13).

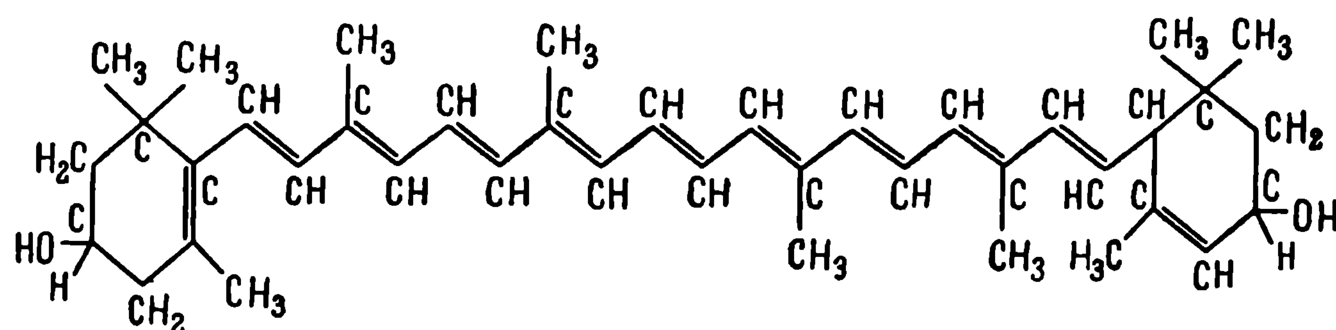


Рис. 13. Структурная формула лютеина.

Зеаксантин — изомер лютеина — имеет структуру 3,3′-дигидрокси-β-каротина (рис. 14).

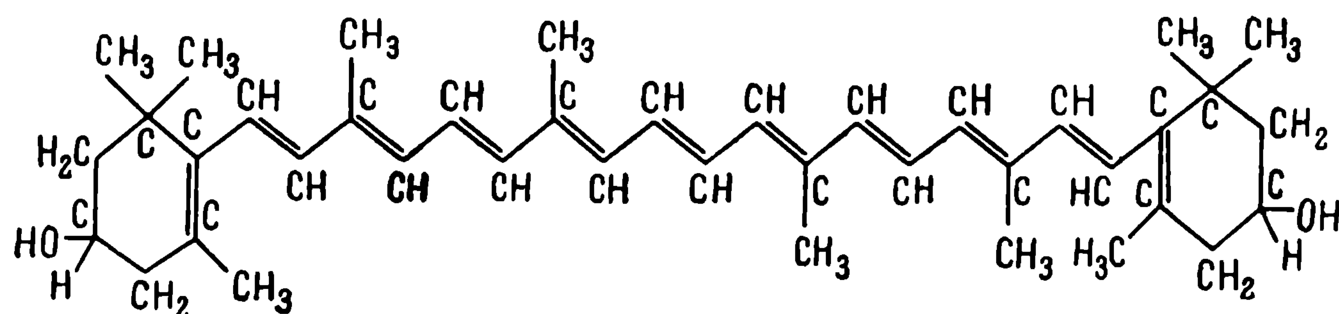


Рис. 14. Структурная формула зеаксантина.

Виолаксантин является следующим за лютеином по содержанию в зеленых листьях.

Как можно видеть из структурной формулы виолаксантина (рис. 15), его можно называть двояким образом: 5 6,5′ 6′-диэпокси-зеаксантин, либо 3,3′-дигидрокси-5 : 6,5′ 6′-диэпокси-β-каротин.

Содержащийся в значительных количествах ксантофилл неоксантин (до 20% от общей суммы каротиноидов листьев) имеет ту же эмпирическую формулу, что и виолаксантин, но отличается

от него наличием лишь одной эпоксидной группы. Точная структурная формула неоксантина еще неизвестна (рис. 16).

Если принять эту формулу, то неоксантин следует называть тригидрокси-5 6-моноэпокси-β-каротин.

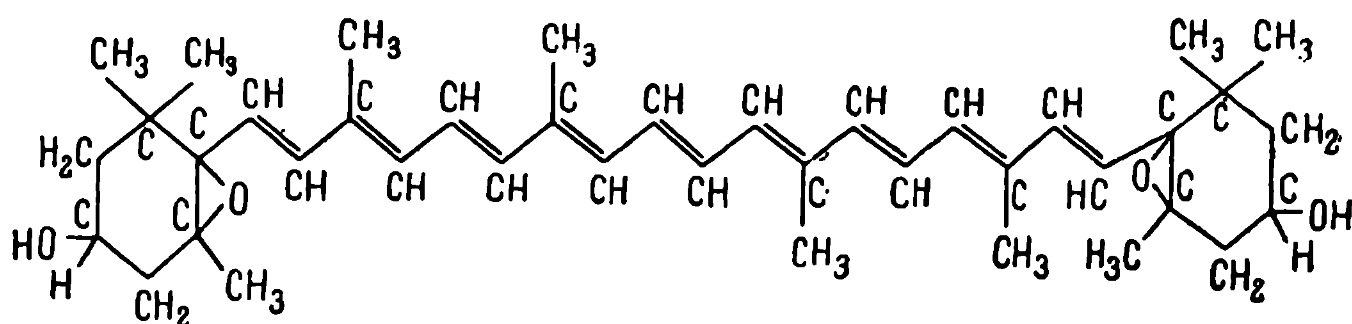


Рис. 15. Структурная формула виолаксантина.

Перечисленные ксантофиллы — лютеин, зеаксантин, виолаксантин и неоксантин — составляют основную часть всех кислородсодержащих каротиноидов пластид зеленых листьев. Вместе с тем следует указать на то, что в пластидах иногда встречаются

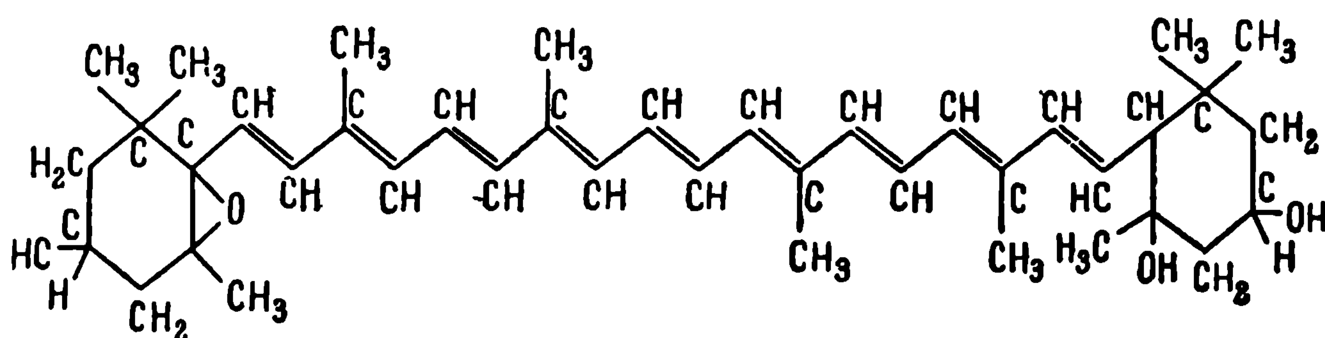


Рис. 16. Структурная формула неоксантина.

в весьма небольших количествах еще два ксантофилла — антераксантин и элоксантин.

Из структурной формулы видно, что антераксантин является 3,3′-дигидрокси-5 6-эпокси-β-каротином (рис. 17).

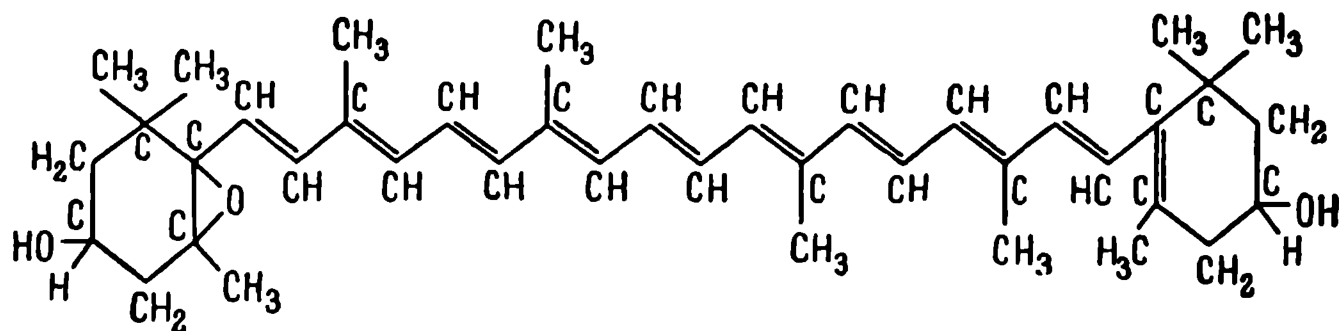


Рис. 17. Структурная формула антераксантина.

Элоксантин является 3,3-дигидрокси-5 : 6-эпокси-α-каротином (рис. 18).

Суммируя сказанное об основных чертах структуры пигментов пластид, можно сказать, что для хлорофиллов характерно наличие в формуле кольца форбина, комплексного атома магния и фитольного «хвоста»; каротины характеризуются системой конъю-

тированных двойных связей и иононовыми кольцами, а ксантофиллы обладают, кроме того, различными кислородными группировками.

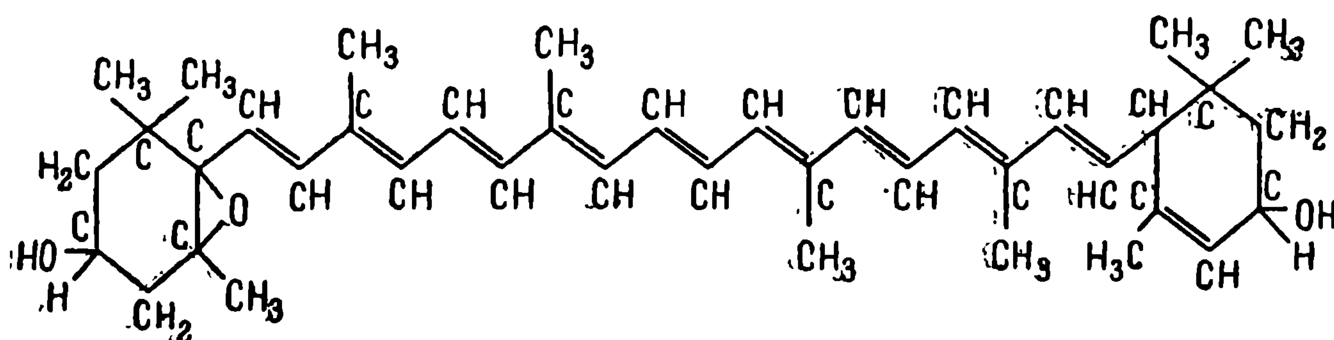


Рис. 18. Структурная формула элоксантина.

СВОЙСТВА ПИГМЕНТОВ ПЛАСТИД

Хлорофиллы

Хлорофилл *a*. В твердом состоянии имеет иссиня-черный цвет. Температура его плавления 117—120°. Легко растворяется в этиловом спирте, этиловом эфире, ацетоне, хлороформе, сероуглероде и бензоле. Раствор его в этиловом эфире имеет красивый сине-зеленый цвет. Плохо растворяется на холоду в метаноле. Очень плохо растворяется в петролейном эфире. Растворы в полярных растворителях обладают очень яркой флуоресценцией. В неполярных высушенных растворителях хлорофилл не флуоресцирует. Спектр поглощения в этиловом эфире характеризуется следующими максимумами в видимой части: 660.0, 612.5, 572.5, 527.5, 497.5, 427.5 и 410.0 ммк. Соотношение максимумов видно из графика спектрального поглощения раствора хлорофилла *a* в этиловом эфире (рис. 19).

Максимум поглощения в 660 ммк имеет специальное название «главного» максимума хлорофилла. Положение главного максимума смещается довольно закономерно в сторону длинноволновой части спектра с увеличением показателя преломления растворителя. Это явление известно в физике как правило Кундта.

Растворитель	Показатель преломления	Максимум поглощения, ммк
Метанол	1.329	664.0
2-этил-1-гексанол	1.430	666.5
Оливковое масло	1.480	669.5

Отношение молярных коэффициентов экстинкции синего (427.5) и красного (660) максимумов в растворах хлорофилла *a* в этиловом эфире равно 1.32. Этот показатель очень хорошо характеризует степень чистоты препарата: чем ближе к нему отношение максимумов в данном препарате, тем чище следует считать препарат.

В зависимости от способа препаративного получения хлорофилл может быть либо в аморфном, либо в кристаллическом виде (подробно о препаративном получении хлорофилла в кристаллическом виде см. главу XI).

Исследование спектров хлорофилла *a* в кристаллическом состоянии обнаружило смещение красного максимума в сторону длинноволновой части спектра до 730 ммк.

Спектр поглощения сдвигается в сторону длинных волн также у «коллоидального» хлорофилла. Коллоидальные растворы хлорофилла получают разбавлением водой растворов пигмента в органическом растворителе. В зависимости от степени агрегации главный максимум сдвигается вплоть до 700 ммк.

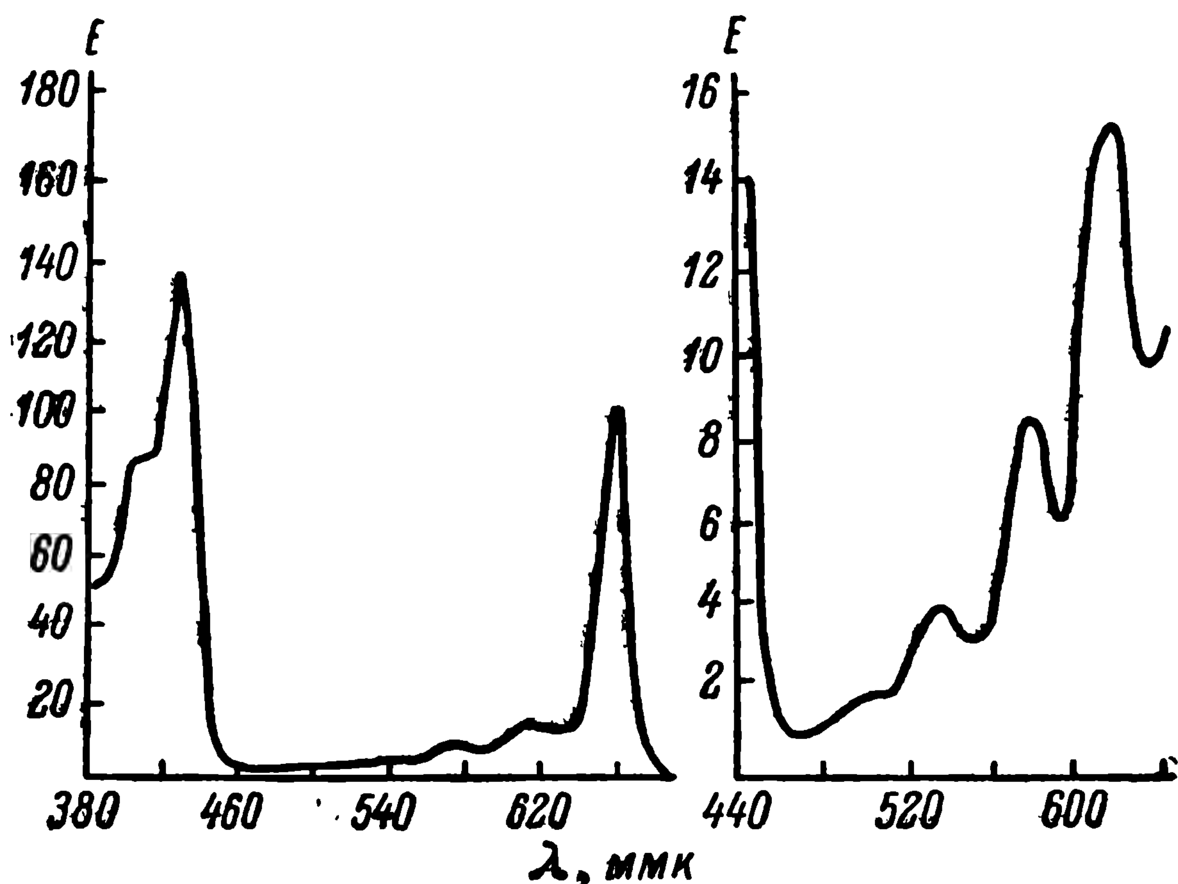


Рис. 19. Спектральные кривые поглощения хлорофилла *a*.

По оси абсцисс — длины волн, *по оси ординат* — коэффициент экстинкции. Правый график представляет часть спектра в увеличенном масштабе.

Для изучения хлорофилла большое значение имеет флуоресценция его растворов. Хлорофилл *a* в видимой части спектра имеет две полосы флуоресценции. Первая эмиссионная полоса имеет максимум при 664.5, а максимум второй эмиссионной полосы лежит при 720.0 ммк.

Растворы хлорофилла обладают также фосфоресценцией, т. е. длительным послесвечением. Максимум фосфоресценции хлорофиллов лежит в инфракрасной области.

Хлорофиллы в твердом состоянии, как и хлорофиллы в листьях, обладают слабой флуоресценцией.

Хлорофилл *b*. В твердом состоянии имеет темно-зеленый цвет. Температура плавления около 125°. По растворимости мало отличается от хлорофилла *a*. Все же хлорофилл *b* лучше раство-

рим в метаноле, чем хлорофилл *a*, и этим можно пользоваться для их разделения (см. главу IX).

Растворы хлорофилла *b* сильно отличаются по цвету от растворов хлорофилла *a*; хлорофилл *b* имеет в спиртовом растворе желто-зеленый цвет. Желтизна особенно заметна при растворении его в сероуглероде. Сочетание окраски хлорофилла *a* с окраской хлорофилла *b*, а также с каротиноидами обусловливает разнообразие оттенков зеленого цвета, которое характерно для окружающей нас наземной растительности.

Спектр поглощения хлорофилла *b*, растворенного в этиловом эфире, имеет также 7 максимумов: 642.5, 592.5, 567.5, 547.5, 502.5, 452.5 и 430.0 ммк (рис. 20).

Как видно из кривой, главный максимум хлорофилла *b* смещен по сравнению с максимумом хлорофилла *a* в сторону коротковолновой части спектра на 200 Å. Синий максимум, напротив, смещен на 200 Å в сторону длинноволновой части спектра. Отношение синего максимума к красному максимуму для хлорофилла *b* равно 3.

Раствор хлорофилла *b* в полярных растворителях флуоресцирует кирпично-красным цветом.

Сопоставим некоторые из физических свойств хлорофиллов.

Свойство	Хлорофилл *a*	Хлорофилл *b*
Окраска		
в твердом состоянии	Сине-черная	Темно-зеленая
разбавленного раствора	Сине-зеленая	Желто-зеленая
Температура плавления	117—120°	120—130°
Растворимость:		
в этиловом эфире	Хорошая	Хорошая
в этаноле	Хорошая	Хорошая
в петролейном эфире	Слабая	Плохая
в воде	Не растворяется	Не растворяется
в метаноле (80%-м)	Слабая	Хорошая
Флуоресценция спиртового раствора	Рубиново-красная	Кирпично-красная

Сложность химического строения хлорофиллов обусловливает большую неустойчивость их молекул в растворах.

Даже в оставленных при комнатной температуре экстрактах образуются изомеры хлорофиллов; при нагревании равновесие между разными изомерами устанавливается за несколько минут. Различить изомеры по спектру невозможно, но при хроматографировании они легко обнаруживаются.

При действии на раствор хлорофилла в спирте 20%-й HCl мгновенно отщепляется магний и образуется феофитин. Концентрированная HCl, кроме того, очень быстро отщепляет фитол с образованием феофорбида.

Производные хлорофилла характеризуются так называемым солянокислым числом. Это число отражает различную степень основности производных хлорофилла. Благодаря слабощелочным свойствам они способны образовывать гидрохлориды, нерастворимые в этиловом эфире. Эта особенность позволяет извлечь из раствора в этиловом эфире то или иное производное раствором

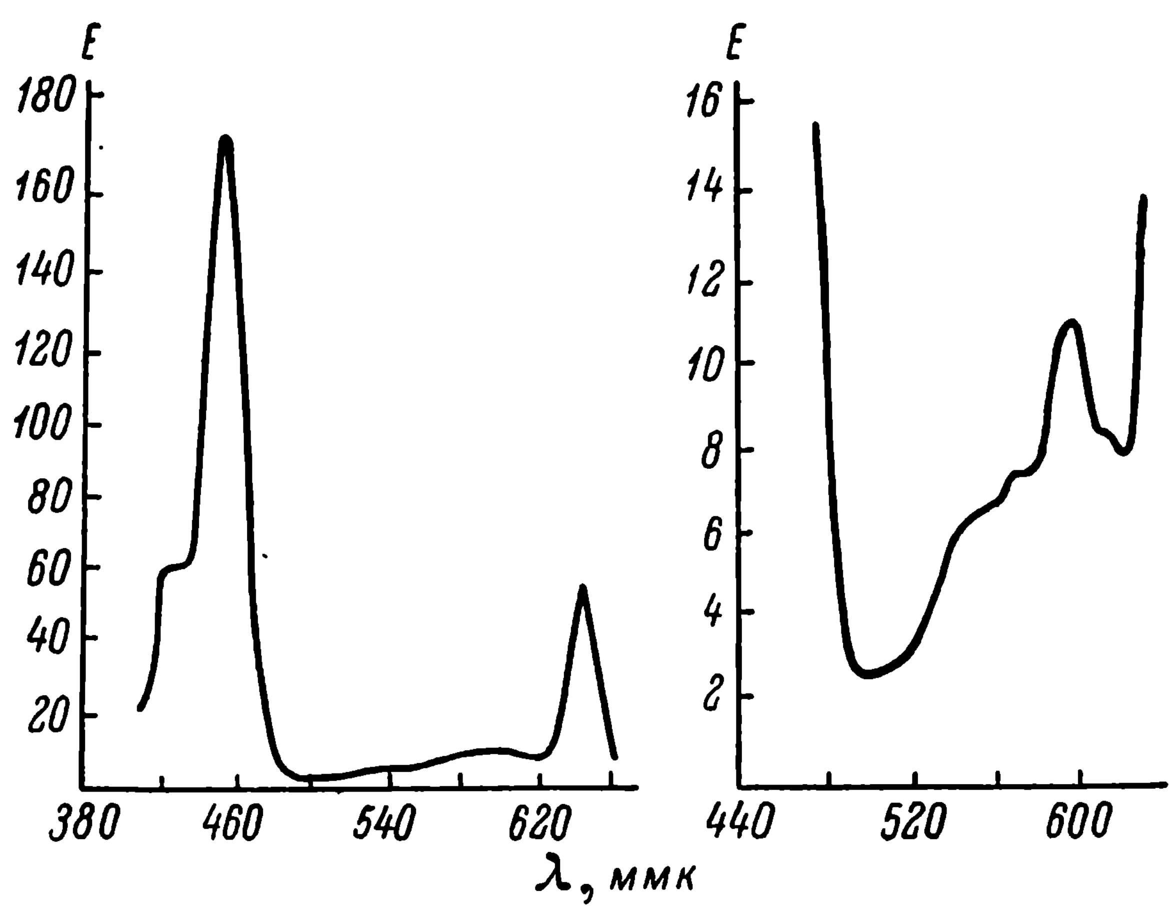


Рис. 20. Спектральные кривые поглощения хлорофилла *b*.

Обозначения те же, что и на рис. 19.

хлористого водорода соответствующей концентрации. Под солянокислым числом разумеют процентное содержание соляной кислоты, извлекающей из равного объема эфира $^2/_3$ растворенного в нем вещества. С помощью указанного показателя можно в известной мере идентифицировать тот пигмент, который имеется в растворе (табл. 3).

Таблица 3

Солянокислые числа хлорофиллов и их производных

Вещество в растворе	Извлекаемое производное	Процентное содержание соляной кислоты, при котором происходит извлечение производных хлорофилла		
		начало	$^2/_3$	полное
Хлорофилл *a*	Феофитин *a*	25	29	32
Хлорофилл *b*	Феофитин *b*	30	35	—
Метилхлорофиллид *a*	Метилфеофорбид *a*	13	16	18
Метилхлорофиллид *b*	Метилфеофорбид *b*	17	21	23
Хлорофиллид *a*	Феофорбид *a*	12	15	17
Хлорофиллид *b*	Феофорбид *b*	16	19.5	22

С уменьшением величины молекулы производного хлорофиллов увеличивается основность производного, благодаря чему оно начинает извлекаться соляной кислотой меньшей концентрации. Кроме того, из таблицы можно еще сделать вывод о том, что производные ряда *a* обладают большей основностью, нежели производные ряда *b*.

Если к эфирному раствору смеси хлорофиллов $a+b$ прибавить спиртовой щелочи, то наблюдается так называемая бурая фаза. Это явление состоит во временном изменении окраски раствора на желтый цвет у хлорофилла *a* и на красный у хлорофилла *b*; вскоре раствор вновь приобретает зеленую окраску. В результате этой реакции под действием щелочи происходит разрыв циклопентанонового кольца между 9-м и 10-м углеродными атомами, т. е. происходит переход форбиновой структуры в хлориновую. Бурая фаза рассматривалась ранее как характерный признак неизмененных хлорофилловых препаратов. Это не совсем так; отсутствие фазовой пробы может служить показателем того, что хлорофилл претерпел определенные изменения, но само по себе наличие фазовой пробы не может служить критерием качества препарата, так как ее можно обнаружить даже в сильно измененных препаратах, содержащих хотя бы небольшую часть неизмененного хлорофилла.

Механизм фазовой пробы связан со способностью карбонильной группы циклопентанного кольца к энолизации; в энольной форме между 9-м и 10-м атомами углерода образуется двойная связь, а карбонил при 10-м атоме углерода превращается в гидроксил за счет водородного атома при 9-м атоме углерода. Энольная форма хлорофилла *a* имеет желтый цвет, а хлорофилла *b* — красный. Энольная форма циклопентанного кольца является неустойчивой, и кольцо разрывается с образованием имеющих зеленый цвет солей хлоринов, в состав которых входит комплексно связанный атом магния.

Окисление хлорофиллов в спиртовых растворах кислородом воздуха или хинонами приводит к образованию так называемого алломеризованного хлорофилла. Окисление идет по 10-му углеродному атому, вследствие чего алломеризованный хлорофилл теряет способность к осуществлению реакции энолизации, т. е. не дает фазовой пробы. Спектральные изменения алломеризованного хлорофилла незначительны, но оказалось, что продукты распада такого окисленного хлорофилла — хлорины и родины — теряют способность к кристаллизации. Реакция алломеризации очень сильно катализируется даже следами щелочи, что приходится учитывать при получении препаратов хлорофилла. Обычно, работая со спиртовыми растворами, несколько подкисляют их щавелевой кислотой. Кроме того, следует помнить, что при хроматографической адсорбции на колонке нужно избегать адсорбентов, которые могут иметь щелочную реакцию; так, например,

недопустимо при работе с хлорофиллами использовать в качестве адсорбента мел или окислы металлов.

Выше было указано, что комплексно связанный магний легко обменивается в кислой среде на два атома водорода. Следует здесь отметить, что атом магния может быть также легко замещен некоторыми другими металлами, например медью, цинком, железом и др. Более того, можно этими металлами вытеснить водород из уже образовавшегося феофитина.

Нами было сказано, что окраска веществ связана с наличием в них хромофорных групп. В молекуле хлорофилла, как видно из ее структурной формулы (рис. 2), имеется большое число центров ненасыщенности: система конъюгированных двойных

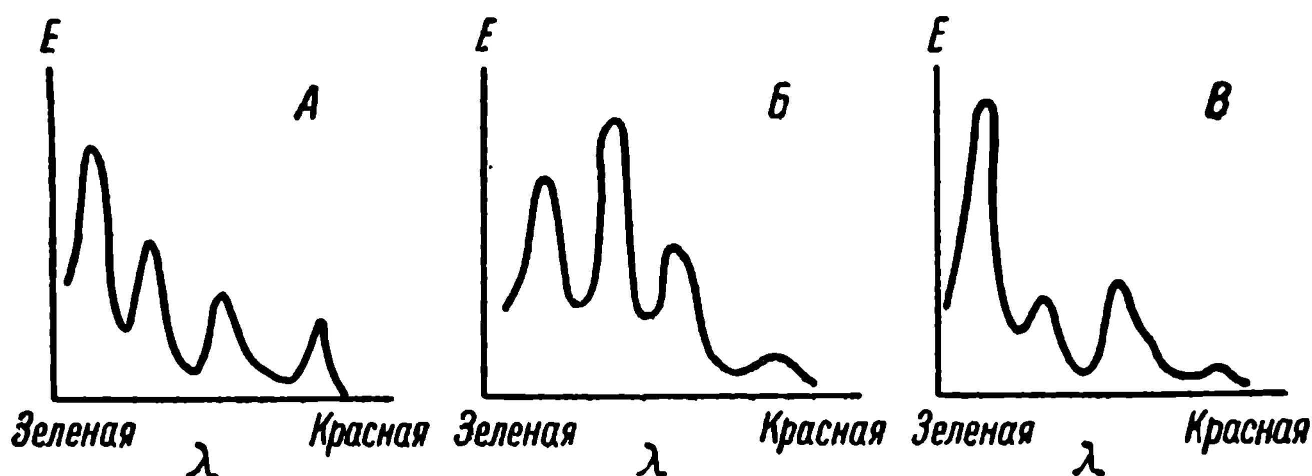


Рис. 21. Типы спектров поглощения порфиринов.

А — этиотип, *Б* — родотип, *В* — филлотип. Остальные обозначения те же, что и на рис. 19.

связей в цикле форбина, карбонильная группа у 9-го атома углерода, винильная группа у 2-го атома углерода, комплексно связанный атом магния, а у хлорофилла *b* еще формильная группа у 3-го атома углерода.

Система конъюгированных двойных связей порфиринов, лежащая в основе строения хлорофиллов и их производных, может быть рассматриваема как одна хромофорная группа; этот хромофор дает сильные полосы поглощения в видимом спектре и близком ультрафиолете. Порфин, являющийся типичным представителем соединений с подобными хромофорными группами, обладает четырьмя полосами поглощения между 480 и 700 ммк. Если считать по направлению от фиолетового края спектра к красному, то интенсивность этих четырех полос располагается в следующем порядке: I>III>II>IV.

Производные порфина, порфирины, имеют различное расположение полос по интенсивности. По существующей классификации спектры порфиринов в соответствии с порядком ослабления полос подразделяются на три типа: «этиотип», у которого полосы ослабляются в порядке I, II, III, IV; «родотип», имеющий порядок II, I, III, IV и «филлотип», характеризующийся указанным выше порядком I, III, II, IV (рис. 21).

Как видно из приведенных спектров, все эти соединения пропускают в красной области, т. е. имеют красную окраску, что и обусловило их название «порфирины».

Гидрирование одного из ядер порфирина, т. е. переход от системы порфина к системе хлорина (или родина), вызывает появление поглощения в красной и сине-фиолетовой частях и ослабление поглощения в желто-зеленой части спектра (рис. 22).

Гидрирование еще одного пиррольного кольца в ядре порфина приводит к образованию тетрагидропорфина и дальнейшему изменению спектра. Бактериохлорофилл, относящийся к производным этого рода, имеет полосу поглощения с наибольшей интенсивностью в инфракрасной области.

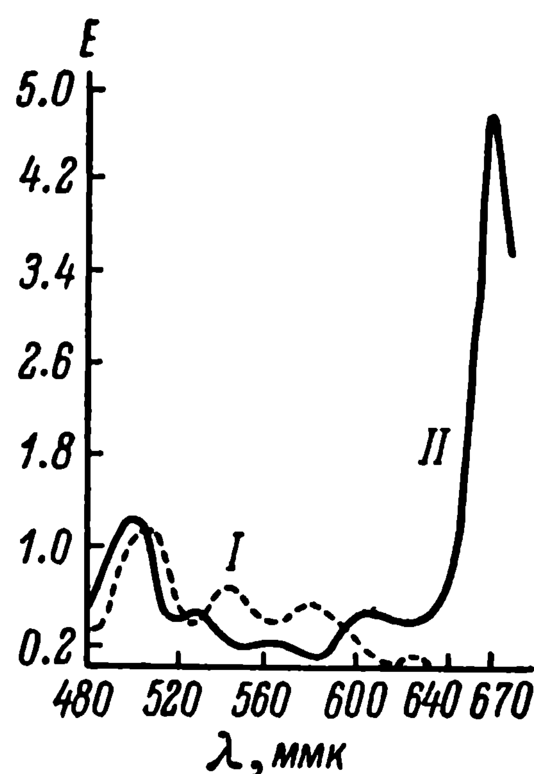


Рис. 22. Влияние гидрирования на спектр поглощения.

I — спектр поглощения хлоропорфирин-e_4-триметилэфира, *II* — спектр поглощения продукта его гидрирования хлорин-e_4-диметилэфира. Остальные обозначения те же, что и на рис. 19.

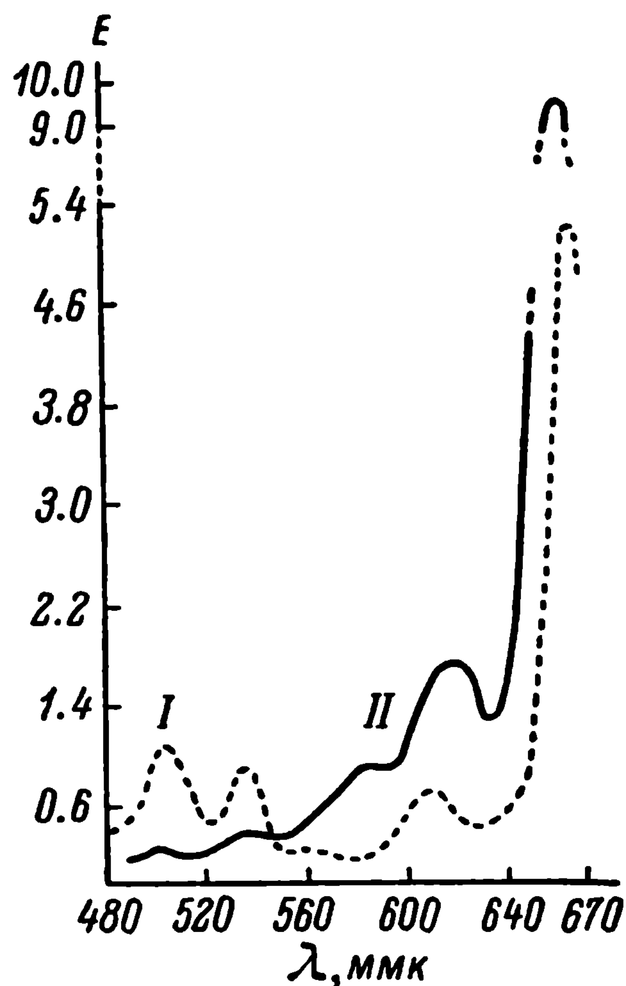


Рис. 23. Влияние введения магния на спектр поглощения.

I — метилфеофорбид, *II* — метилхлорофиллид *a*. Остальные обозначения те же, что и на рис. 19.

Спектроскопический эффект карбоксильных групп и их этерификации невелик. Так, например, видимый спектр хлорофиллида почти тождествен спектру фитил-хлорофиллида, т. е. хлорофилла.

Замыкание изоцикла слабо влияет на спектр. Гораздо более сильный эффект оказывает карбонильная группа во II кольце хлорофилла *b*. Им объясняется желто-зеленый цвет хлорофилла *b* и сине-зеленый цвет хлорофилла *a*. Хлорофилл *a* поглощает сильно в фиолетовых и ультрафиолетовых лучах и пропускает

синие лучи, а у хлорофилла *b* в синих лучах расположен максимум поглощения.

Карбонильная группа в изоцикле в положении у 9-го атома углерода не оказывает большого влияния на спектр.

Введение в молекулу магния (образование из форбина филлина) ведет к дальнейшему усилению главной полосы поглощения в красной области и к ослаблению поглощения в зеленой (рис. 23).

Описанные выше факты ясно свидетельствуют о наличии тесной зависимости между строением и спектральными свойствами хлорофиллов и их производных.

Каротиноиды

β-Каротин. При кристаллизации из смеси бензола и метанола образует темно-фиолетовые гексагональные призмы; из раствора в петролейном эфире кристаллизуется в виде красных ромбовидных, почти квадратных листочков.

Точка плавления лежит между 181—182°.

Очень хорошо растворяется в сероуглероде, бензоле и хлороформе, довольно хорошо растворяется в петролейном и этиловом эфирах. В 100 мл гексана можно растворить при 0° 109 мг β-каротина. В метаноле и этаноле почти нерастворим. В воде не растворяется.

Имеет характерный спектр поглощения; число максимумов зависит от растворителя.

Растворитель	Максимумы поглощения β-каротина, ммк		
Сероуглерод	520.0	485.0	450.0
Хлороформ	497.0	466.0	—
Бензин	483.5	452.0	426.0
Гексан	482.0	451.0	—

Кривая спектра поглощения β-каротина в гексане приводится на рис. 24.

Раствор β-каротина в хлороформе при обработке концентрированной серной кислотой реагирует с образованием синего продукта, переходящего в слой серной кислоты.

β-Каротин, растворенный в хлороформе, при обработке дымящейся азотной кислотой окрашивается сразу в синий цвет, который затем переходит в зеленый и грязно-желтый.

Раствор в хлороформе реагирует с треххлористой сурьмой в том же растворителе, окрашивается в темно-синий цвет; максимум поглощения 490 ммк.

В силу своего симметричного строения оптической активностью не обладает.

При обработке раствора β-каротина в 90%-м метаноле петролейным эфиром он почти нацело переходит в последний раство-

ритель; отношение концентраций в петролейном эфире и в 90%-м метаноле 660 : 1.

Одним из характерных свойств β-каротина является его способность адсорбироваться на окислах металлов. В то же время он вовсе не адсорбируется из петролейноэфирного раствора на сахарозе.

Обладает слабой зеленой флуоресценцией.

Жадно поглощает кислород из воздуха.

α-Каротин. Из смеси бензола с метанолом кристаллизуется в виде плоских фиолетовых призм, часто образующих друзы. Из петролейного эфира кристаллизуется в виде темно-фиолетовых призм или многогранников.

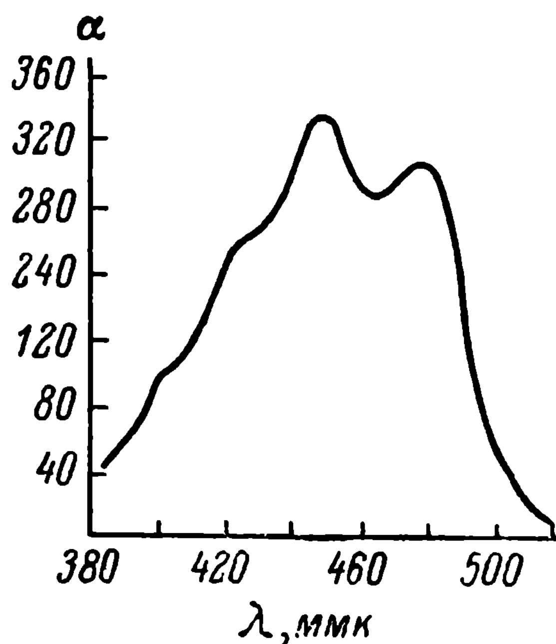


Рис. 24. Спектральная кривая β-каротина в гексане.

По оси абсцисс — длины волн, *по оси ординат* — удельный коэффициент поглощения.

Температура плавления 187—188°.

Растворимость α-каротина гораздо лучше, чем β-каротина. 100 мл гексана при 0° растворяют 294 мг α-каротина. В хлороформе и сероуглероде растворяется с большой легкостью, в бензоле и этиловом эфире легко, а в петролейном эфире с трудом. В спиртах почти не растворяется.

Максимумы поглощения α-каротина значительно отличаются от таковых у β-каротина.

Растворитель	Максимумы поглощения α-каротина, ммк	
Сероуглерод	509.0	477.0
Бензин . .	478.0	447.5
Хлороформ .	485.0	454.0

Как и β-каротин, окрашивается в синий цвет при действии на раствор его в хлороформе серной кислоты. Реакция с треххлористой сурьмой дает продукт с максимумом поглощения 542 ммк (сравни с максимумом β-изомера).

В силу ассиметричности строения α-каротин оптически активен; удельное вращение составляет в бензоле +385°.

При распределении между петролейным эфиром и 90%-м метанолом α-каротин полностью переходит в эпифазный растворитель (см. главу IX).

Каротин жадно поглощает кислород.

γ-Каротин. Наименее распространенный пигмент пластид. В пластидах листьев его нет совсем, а в пластидах корней моркови он содержится в количестве 0.1% от количества β-каротина.

Кристаллизуется из смеси бензол+метанол в виде микроскопических темно-красных призм с синеватым отливом. При быст-

рой кристаллизации пигмент выпадает в виде более светлых иголочек.

Температура плавления лежит между 176.5 и 178°.

В обычных растворителях растворяется слабее, чем β-изомер.

Ниже приведены максимумы поглощения в различных растворителях.

Растворитель	Максимумы поглощения γ-каротина, ммк		
Сероуглерод	533.5	496.0	463.0
Хлороформ	508.5	475.0	446.0
Бензол	510.0	477.0	447.0
Бензин	495.0	462.0	431.0
Гексан	494.0	462.0	431.0

Оптически неактивен.

Как и α-каротин, при распределении между петролейным эфиром и 90%-м метанолом переходит полностью в эпифазу.

Ликопин. Кристаллизуется из смеси сероуглерода и этилового спирта в виде длинных карминово-красных иголочек. Цвет порошка темно-красный. В отличие от других каротиноидов кристаллы не имеют металлического блеска.

Температура плавления лежит между 170 и 175°.

Очень хорошо растворяется в сероуглероде и нагретом хлороформе, легко растворяется в хлороформе на холоду и в бензоле и почти нерастворим в этиловом и метиловом спиртах.

Обладает в видимом спектре тремя максимумами поглощения, положение которых зависит от растворителя.

Растворитель	Максимумы поглощения ликопина, ммк		
Сероуглерод	548.0	507.5	477.0
Хлороформ	517.0	480.0	453.0
Бензол	522.0	487.0	455.0
Бензин	506.0	475.5	447.0
Этанол	503.0	472.0	443.0

Оптически неактивен.

Растворяется в концентрированной серной кислоте с образованием продуктов синего цвета. При действии дымящей азотной кислоты окрашивается в пурпурный цвет. С треххлористой сурьмой дает интенсивную синюю окраску, которая вскоре исчезает.

Лютеин. Кристаллизуется из метанола в виде фиолетовых призм с металлическим блеском. Порошок имеет кирпично-красный цвет.

Температура плавления 193°.

Хорошо растворяется в хлороформе, бензоле, ацетоне, этиловом эфире и сероуглероде; в этаноле и метаноле растворяется

хуже, а в петролейном эфире почти нерастворим. 1 мл кипящего метанола растворяет 1 мг лютеина.

Раствор лютеина в сероуглероде имеет красную окраску; разбавленные растворы в бензоле, этаноле, этиловом эфире и хлороформе имеют золотисто-желтый цвет, а концентрированные растворы — оранжевый.

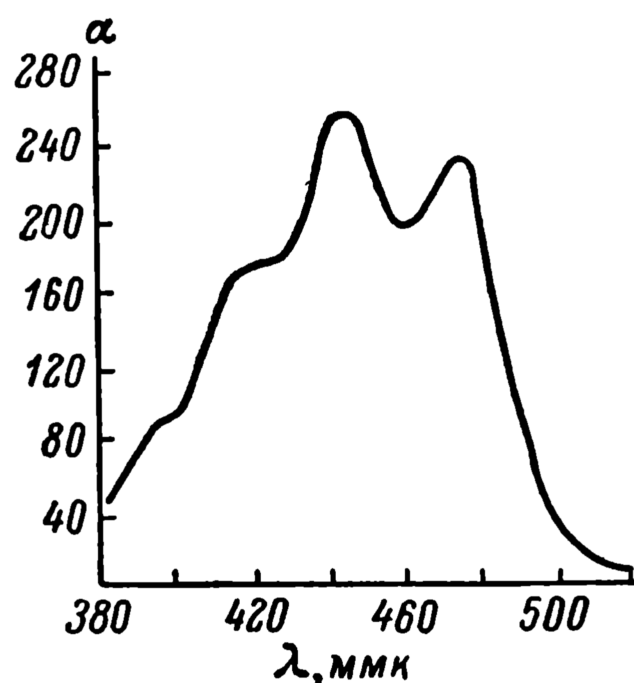


Рис. 25. Спектр поглощения лютеина в этаноле.

Обозначения те же, что и на рис. 24.

Как и α-каротин, оптически активен; удельное вращение в хлороформе +160°.

В концентрированной серной кислоте растворяется с образованием продуктов зеленой окраски, которая переходит в синюю. С концентрированной муравьиной кислотой дает ярко-зеленую окраску. Реакция с треххлористой сурьмой в хлороформе дает темно-синюю окраску.

При распределении между 90%-м метанолом и петролейным эфиром переходит в нижнюю фазу.

Ниже приведены максимумы поглощения лютеина в различных растворителях.

Растворитель	Максимумы поглощения лютеина, ммк		
Сероуглерод	508.0	475.0	445.0
Хлороформ	487.0	456.0	428.0
Этанол	476.0	446.5	420.0
Бензин	477.5	447.5	420.0
Метанол .	473.5	444.0	418.0

На рис. 25 приведен спектр поглощения лютеина в этаноле. Лютеин обладает флуоресценцией в зелено-желтой области.

Зеаксантин. Пигмент кристаллизуется из метанола в виде длинных желтых листочков, соединяющихся в пучки. Из этанола кристаллизуется в виде коротких толстых ромбических призм. Из смеси растворителей, состоящей из сероуглерода, петролейного эфира и этилового эфира, кристаллизуется в виде иголочек, собирающихся в пучки.

Температура плавления около 210°.

В 1 мл кипящего метанола можно растворить 0.7 мг зеаксантина. В петролейном эфире и гексане пигмент почти нерастворим. Несколько выше растворимость его в этиловом эфире, хлороформе, сероуглероде и пиридине. Суспензия в ледяной уксусной кислоте растворяется при добавлении гексана,

Ниже приводятся максимумы поглощения зеаксантина.

Растворитель	Максимумы поглощения зеаксантина, ммк		
Сероуглерод	517.0	482.0	450.0
Хлороформ	495.0	462.0	429.0
Этанол	483.0	451.0	423.5
Бензин	483.5	451.5	423.0
Метанол .	480.0	449.5	421.5

В смеси метанол+петролейный эфир ведет себя, как гипофазный пигмент.

В концентрированной серной кислоте образует темно-синие довольно стойкие растворы. С треххлористой сурьмой дает синее окрашивание.

Спектр зеаксантина в этаноле приводится на рис. 26.

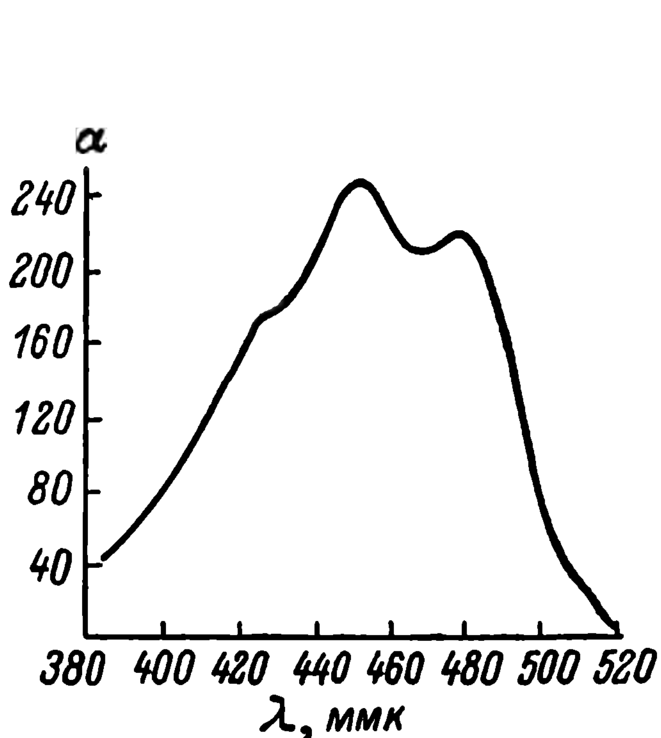


Рис. 26. Спектральная кривая зеаксантина в этаноле.

Обозначения те же, что и на рис. 24.

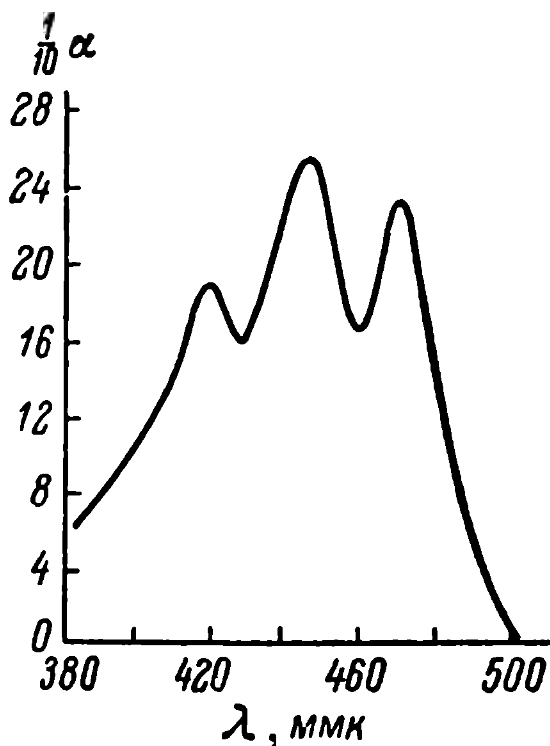


Рис. 27. Спектральная кривая виолаксантина в этаноле.

Обозначения те же, что и на рис. 24.

Виолаксантин. Кристаллизуется из метанола в виде желто-оранжевых призм, из сероуглерода — в виде красно-коричневых иголок.

Температура плавления 200°.

Хорошо растворяется в этаноле, метаноле, сероуглероде и этиловом эфире. В петролейном эфире почти не растворяется.

Ниже приведены максимумы поглощения виолаксантина в различных растворителях.

Растворитель	Максимумы поглощения виолаксантина, ммк		
Сероуглерод	501.0	470.0	440.0
Хлороформ	482.0	451.5	424.0
Бензин	472.0	443.0	417.5
Этанол	471.5	442.5	417.5
Метанол .	469.0	440.0	415.0

На рис. 27 приведен спектр поглощения виолаксантина в этаноле.

Для виолаксантина имеется специфическая реакция, состоящая в действии на его эфирный раствор 20%-й соляной кислотой.

Под действием слабых кислот виолаксантин претерпевает превращения в мутатоксантин или ауроксантин (мутатоксантин — фураноидный изомер антераксантина, а ауроксантин — фураноидный изомер виолаксантина).

Неоксантин. Пигмент кристаллизуется из смеси хлороформ+ +петролейный эфир в виде оранжевых пластинок.

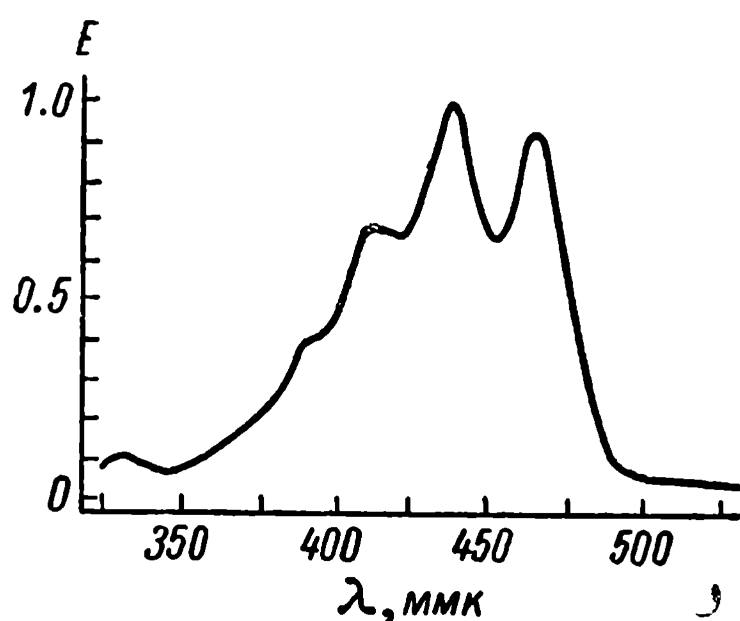


Рис. 28. Спектральная кривая неоксантина в этаноле.

Обозначения те же, что и на рис. 19.

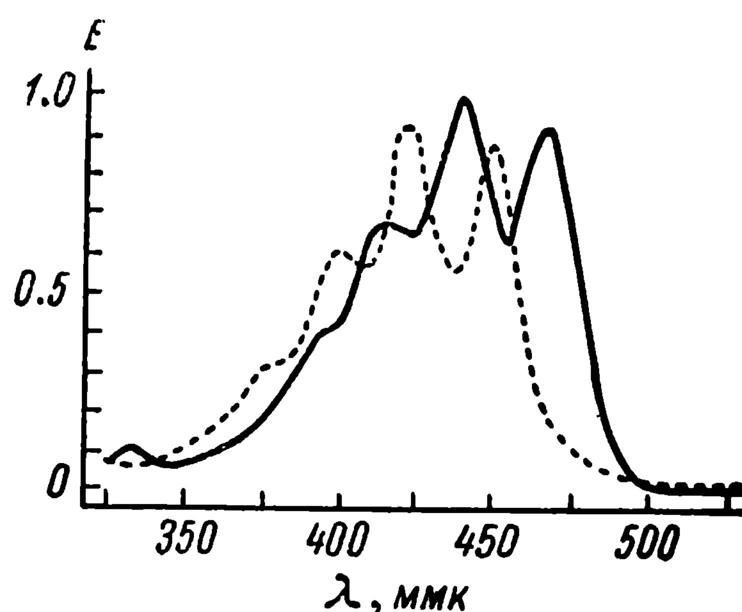


Рис. 29. Действие соляной кислоты на спектр неоксантина.

Пунктиром обозначен спектр получающегося продукта. Остальные обозначения те же, что и на рис. 19.

Температура плавления 205°.

Хорошо растворяется в спиртах, ацетоне, этиловом эфире. В хлороформе и сероуглероде растворяется хуже. Почти не растворяется в петролейном эфире и гексане.

При распределении между петролейным эфиром и 60%-м водным метанолом весь пигмент переходит в гипофазу.

На рис. 28 приводится спектр поглощения неоксантина в этаноле.

При добавлении следов соляной кислоты эпоксидная группа превращается в фураноидную группу; при этом происходит значительное изменение спектра поглощения (рис. 29).

ГЛАВА IV

СВОЙСТВА ПИГМЕНТОВ В ЖИВОЙ ПЛАСТИДЕ

Описанные в главе III свойства присущи пигментам пластид, находящимся в виде растворов в органических растворителях. В таких растворах отдельные молекулы пигмента распределяются между молекулами растворителя; это означает, что они максимально диспергированы. При изменении степени дисперсности любая агрегация молекул пигментов приводит к изменениям их свойств. При этом возможны два случая: либо молекулы пигмента агрегируют друг с другом, либо молекулы пигмента агрегируют с каким-нибудь другим веществом. Примером первого вида агрегации являются водно-коллоидальные растворы хлорофилла; степень агрегации в них определяется рядом факторов, как, например, концентрацией пигмента, наличием ионов двух- и трехвалентных металлов и т. п. Другой вид агрегации наблюдается при образовании комплексов пигментов с высокомолекулярными соединениями. Именно такого рода комплексы с белками и липоидами — фитохромопротеиды — образуют пигменты в живой пластиде. Ниже будут рассмотрены свойства хлорофиллов и каротиноидов в живой пластиде.

Исследования спектров поглощения живых объектов (целых листьев, суспензий хлоропластов и одноклеточных водорослей) обнаруживают смещение красного максимума в сторону длинноволновой части спектра по сравнению со спектрами ацетоновой или спиртовой вытяжки: для хлорофилла *a* максимум в красных лучах приходится на длину волны в 680—690 ммк, а для хлорофилла *b* — 650—655 ммк; синий максимум претерпевает аналогичные смещения (рис. 30).

Максимумы поглощения каротиноидов также смещаются в сторону длинноволновой части спектра.

Смещение максимумов спектров поглощения пигментов в известной степени варьирует у разных организмов. Оно может быть обусловлено различиями в качественном составе липоидно-белкового носителя, а также степенью агрегации молекул.

Пиг	Максимумы поглощения каротиноидов	
	в диэтиловом эфире	в хлоропластах
Каротин	475	485
	448	455
Ксантофилл	470	485
	442	455

За последние годы благодаря применению более чувствительных спектрофотометров удалось обнаружить сложное строение максимумов поглощения хлорофиллов; так, оказалось, что красный максимум хлорофилла *a* содержит несколько пиков: 670, 683, 693, 700—710 ммк. Это явление объясняется, по-видимому, наличием разных форм фитохромопротеидного комплекса. О природе этих форм с определенностью сказать что-либо трудно; можно лишь предположить, что они отличаются по химическому составу, по характеру связи пигментов с носителями, а также по степени агрегации самих пигментов. Это предположение частично подтверждается опытами, в которых исследовалось отношение фитохромопротеидного комплекса к различного рода растворителям.

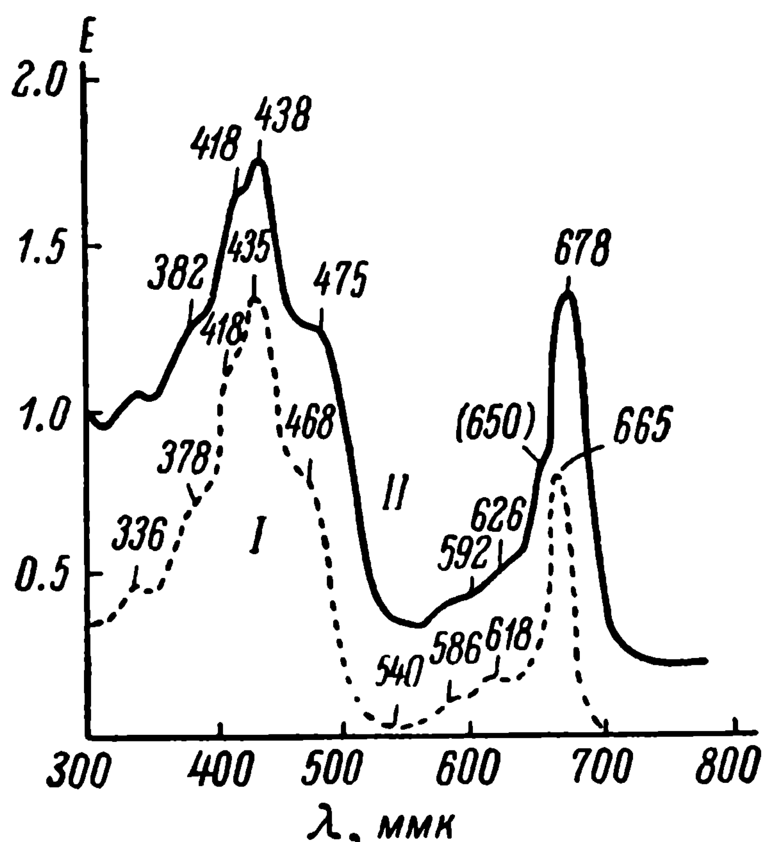


Рис. 30. Сравнение спектров поглощения хлореллы (*I*) и спиртовой вытяжки пигментов (*II*).

Обозначения те же, что и на рис. 19.

Отношение отдельных пигментов фитохромопротеидного комплекса к тому или иному растворителю зависит от двух условий: от растворимости в этом растворителе и от способности растворителя вызывать денатурацию комплекса. Так, например, известно, что хлорофилл легко растворяется в таких растворителях, как спирты и ацетон. В то же время абсолютный спирт, не вызывающий денатурации, не извлекает хлорофилла из осторожно высушенных листьев. Если листья предварительно до высушивания подвергнуть термической денатурации (нагреванием или замораживанием), то абсолютный спирт начинает извлекать хлорофилл. Другим примером, свидетельствующим о необходимости денатурации комплекса для последующего извлечения хлорофилла полярными растворителями, является тот факт, что охлажденный до +5° ацетон не извлекает хлорофилла даже из свежих листьев. Это объясняется тем обстоятельством, что холодный ацетон не вызывает денатурации комплекса.

Чистые неполярные растворители (бензин, петролейный эфир, гексан) не извлекают хлорофилл из ненарушенного фитохромопротеидного комплекса, но даже небольшие примеси полярного растворителя к неполярному, например спирта к петролейному эфиру, приводит к частичному извлечению хлорофилла из комплекса; полное извлечение хлорофилла из листьев может быть достигнуто уже при 2%-й концентрации спирта в петролейном эфире.

После денатурации фитохромопротеидного комплекса листьев действием целого ряда различных факторов — высокой температуры, анаэробиоза, ультразвуковых колебаний, ультрафиолетового облучения, механического воздействия — хлорофилл начинает частично извлекаться чистым неполярным растворителем. Это происходит, по-видимому, вследствие нарушения связи хлорофилла с белковой частью комплекса и растворения его в липоидной части комплекса, отщепляющейся от белка в ходе денатурации.

Факты, демонстрирующие неполное извлечение хлорофилла неполярными растворителями после денатурации комплекса, свидетельствуют о различной степени прочности связей хлорофилла с липопротеидами или о различном характере этих связей, что может объясняться существованием в пластиде разных форм хлорофилл-белково-липоидных комплексов. Это обстоятельство находится в соответствии с приведенными выше данными о наличии нескольких пиков в области красного максимума спектра поглощения хлорофилла *а*.

В зависимости от методов, применявшихся различными исследователями, формы хлорофилл-белково-липоидных комплексов рассматривались как мономерные и агрегированные, гидрофильные и гидрофобные, термолабильные и термостабильные, связанные химически или адсорбционно, молодые и старые. Эти названия, по-видимому, характеризуют отдельные свойства различных форм комплексов. Вполне возможно, что истинные комплексы, существующие в пластидах, обладают различными комбинациями этих свойств.

Совокупность многих исследований позволяет с уверенностью считать доказанным существование по крайней мере двух форм фитохромопротеидного комплекса, отличающихся по характеру связи. Несмотря на то, что их природа еще далеко не изучена, опыты по извлекаемости смесью растворителей приводят к предположению о том, что одна из них является формой, в которой хлорофилл химически связан с белково-липоидным комплексом, а другая содержит хлорофилл, адсорбционно связанный с белком.

В этих опытах использовалась смесь этилового спирта и петролейного эфира в различных соотношениях. Концентрации спирта в петролейном эфире были подобраны с градацией в 0.1% в интервале 0—2%. В результате обработки листьев различных растений этими смесями были получены данные по извлекаемости

хлорофилла, на основании которых были построены кривые характерной формы (рис. 31).

С увеличением концентрации спирта в петролейном эфире извлекаемость хлорофилла растет. Она изменяется, однако, не прямолинейно в зависимости от концентрации спирта. На кривой можно различить несколько кардинальных точек: точку, соответствующую концентрации спирта, при которой начинает извлекаться хлорофилл (*1*), при которой нарушается пропорциональность извлечения (*2*), при которой заканчивается первый подъем извлечения хлорофилла (*3*), и точку, соответствующую концентрации спирта, при которой хлорофилл извлекается полностью (*4*).

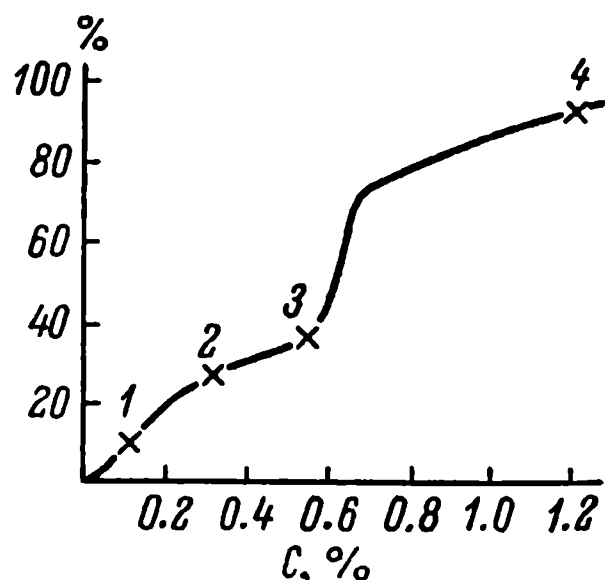


Рис. 31. Кривая извлекаемости хлорофилла из листьев лигуструма.

По оси абсцисс — концентрация спирта в петролейном эфире, *по оси ординат* — количество извлекаемого хлорофилла. *1—4* — кардинальные точки.

Такой характер кривой извлекаемости хлорофилла смесью полярного и неполярного растворителей дает основание допустить существование в листьях двух форм хлорофилл-белковых комплексов. Из одной формы комплекса извлекается часть хлорофилла при более низких концентрациях спирта в петролейном эфире, а остальная часть извлекается при более высоких концентрациях. Та часть хлорофилла, которая извлекается при низких концентрациях спирта, не вызывающих еще денатурации, удерживается в комплексе с белком, по-видимому, адсорбционными непрочными связями. Другая часть, извлекаемая при денатурирующих концентрациях спирта, по всей вероятности, более прочно, химически, связана с липопротеидами.

Представление о существовании двух форм хлорофилла подкрепляется данными опытов по извлекаемости хлорофилла петролейным эфиром из листьев, подвергнутых термическому воздействию. После кратковременной термической обработки листьев петролейный эфир извлекает только часть хлорофилла; остаток можно извлечь лишь при добавлении полярного растворителя. По-видимому, первая часть представляет собой хлорофилл, находящийся в связи с липопротеидами, а вторая — форму, связанную с белком. Количественное соотношение этих форм сильно варьирует у представителей различных видов растений.

Извлекаемость хлорофилла после термической обработки листьев, %

Ginkgo biloba L.	90.2	*Araucaria araucana* (Molina) K. Koch . .	100.0
Araucaria angustifolia (Bert.) O. Kunze.	100.0	*Taxodium distichum* L.	90.0

Pinus patula Lamb.	88.5
Taxus baccata L. . .	54.4
Cunninghamia lanceolata Hook. . .	74.0
Cupressus sempervirens L.	70.5
Thuja occidentalis L.	66.0
Juniperus virginiana L. . .	60.5
Juniperus drupacea Labill.	42.0
Thea sinensis L. . . .	93.0
Magnolia grandiflora L.	41.5
Rosa hybrida Schleich.	70.7
Nymphaea lutea L. . . .	68.0
Rhododendron caucasicum Pall.	66.0
Platanus orientalis L. .	65.0
Eucalyptus viminalis Labill.	61.1
Osmanthus ilicifolius Hort.	58.7
Camellia japonica L.	57.5
Paeonia hybrida Hab. .	56.6
Laurocerasus officinalis Roem.	54.5
Cinnamomum camphora L.	53.0
Laurus nobilis L. . . .	52.0
Rhododendron ponticum Willk.	51.5
Syringa vulgaris L.	48.5
Nerium oleander L. .	45.7
Viburnum rhytidophyllum Hemsl.	43.0
Hedera colchica Koch	45.5
Olea europaea L.	40.2
Acacia dealbata F. Muell.	38.5
Buxus sempervirens L. . .	38.0
Eupatorium micrantum Less.	36.7
Rhododendron luteum Sweet.	35.5
Phyllostachys edulis A. a. C. Riviere	20.0

В настоящее время установлено, что в фитохромопротеидном комплексе наряду с хлорофиллами содержатся и каротиноиды. В соответствии с химической природой того или иного каротиноида прочность образуемой связи с отдельными компонентами комплекса различна. О прочности этой связи можно судить по времени растирания листьев с петролейным эфиром, которое необходимо для начала извлечения пигмента (рис. 32). Каротин начинает извлекаться с момента начала растирания, полное извлечение его достигается через 20—30 мин. Остальные каротиноиды начинают извлекаться несколько позже и следуют за каротином в таком порядке: лютеин, виолаксантин и неоксантин. В отличие от хлорофилла все каротиноиды можно извлечь чистым петролейным эфиром. Таким образом, каротиноиды по способности к комплексообразованию отличаются от хлорофилла существенным образом. Различия в прочности связи отдельных каротиноидов объясняются, по-видимому, разницей в их химическом строении; с большой долей вероятности можно считать, что определяющим моментом является число гидроксильных групп в молекуле пигмента (см. главу III).

Что касается углеводорода — каротина, то не исключена возможность его существования как в виде молекулярного раствора в липоидах, так и в связанном с белками состоянии.

Интересной особенностью пигментно-белково-липоидного комплекса является его высокая лабильность; он претерпевает в течение всей жизни листа вполне закономерные изменения.

При зеленении этиолированных проростков сначала образуется мономерная форма хлорофилл-белково-липоидного комплекса с максимумом поглощения в 670 ммк. При дальнейшем накоплении хлорофилла начинает преобладать агрегированная форма комплекса с полосой поглощения 678—680 ммк. Во взрослом, вполне сформировавшемся листе количество мономерной

формы составляет всего около 5—7%. Эта форма иногда называется быстро выцветающей.

При старении листьев происходит ослабление прочности связей пигментов в комплексе. Оно проявляется в увеличении извлекаемости хлорофилла петролейным эфиром после терми-

Объект	Извлеченный хлорофилл, %			
	июнь	июль	август	сентябрь
Пшеница 'Диамант'	47.2	51.5	62.2	71.0
Сирень обыкновенная .	62.3	50.9	71.7	87.0
Горчица белая .	56.1	58.4	65.0	90.0

ческой обработки. Такие возрастные изменения в фитохромопротеидном комплексе обусловлены целым рядом причин, в част-

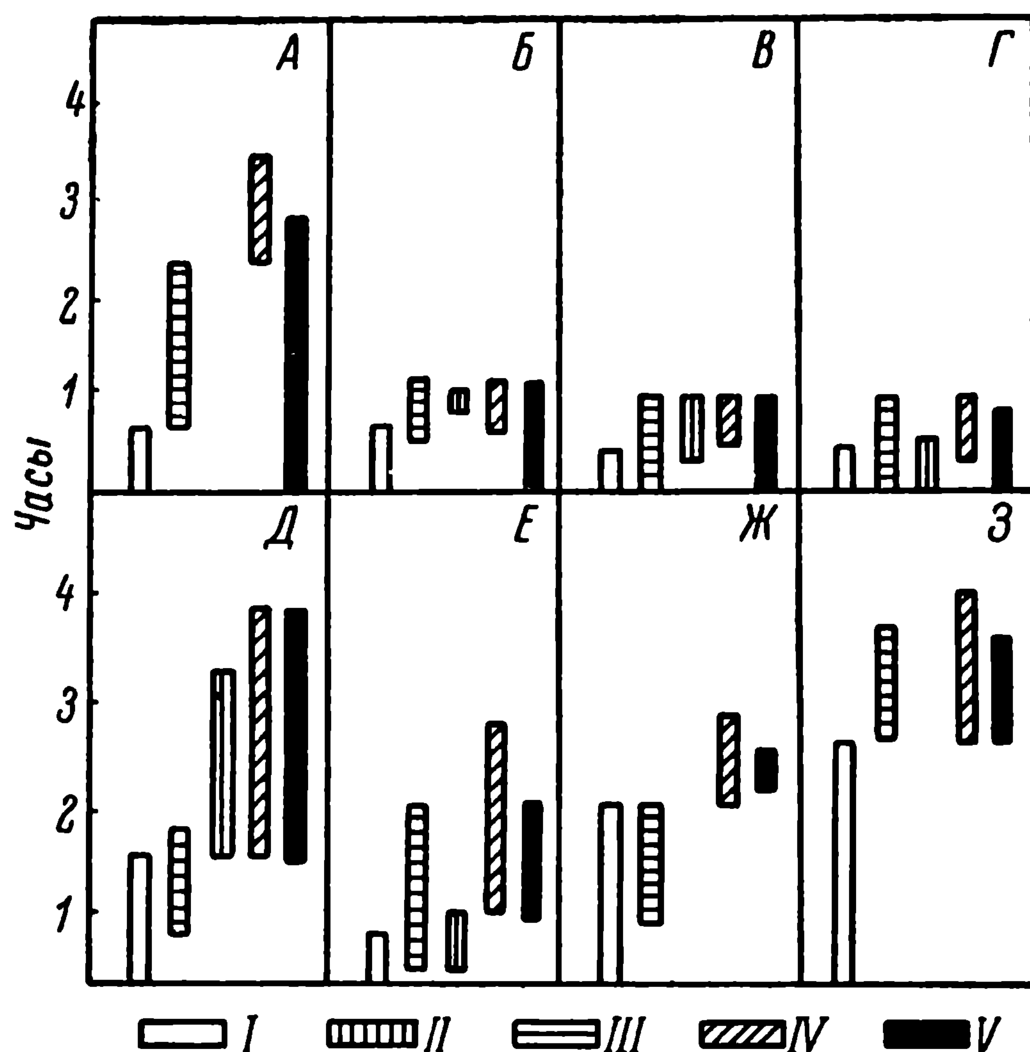


Рис. 32. Извлечение пигментов из листьев петролейным эфиром.

А — Betula alba, Б — Thuja occidentalis, В — Picea excelsa, Г — Pinus silvestris, Д — Aspidistra elatior, Е — Taraxacum officinale, Ж — Aegopodium podagraria, З — Aloe arborescens. I — каротин, *II* — лютеин, *III* — виолаксантин, *IV* — феофитин, *V* — хлорофилл.

ности, физико-химическими изменениями, совершающимися в клетке, и химическими изменениями белков комплекса. Так, например, в старых листьях наблюдается повышение вязкости белков, что можно объяснить укрупнением белковых молекул. При этом происходит уменьшение общей поверхности белка,

приводящее к уменьшению числа его реакционноспособных групп и, в конечном счете, к ослаблению прочности комплекса. На свойствах комплекса могут сказываться и возрастные изменения липоидной его компоненты. В старых листьях увеличивается содержание свободных липоидов; белки пластиды становятся менее «защищенными», вследствие чего хлорофилл легче отрывается от белка.

Наконец, с возрастом листа и сам хлорофилл может синтезироваться менее интенсивно вследствие инактивации хлорофиллазы. Это приводит к накоплению бесфитольного пигмента — хлорофиллида, количество которого в осенних листьях может достигать 50%.

Все вышеизложенное наглядно свидетельствует об изменениях отдельных свойств пигментов при образовании ими комплексов с липопротеидами. Интегрально эти изменения сказываются в повышении устойчивости всех компонентов комплекса. Так, пигменты становятся более устойчивыми к действию света и кислорода, кислотности клеточного сока. С другой стороны, сами носители-протеиды, образуя комплексы с пигментами, оказываются защищенными от денатурации.

Эта устойчивость настолько значительна, что сохраняется даже после дезинтеграции клетки до субцеллюлярных структур. Такими структурами являются хлоропласты, граны и квантазомы. Хлоропласты сохраняют способность к осуществлению в определенных условиях всех реакций фотосинтеза: выделения кислорода, восстановления углекислоты и фотосинтетического фосфорилирования. Граны и квантазомы, являющиеся структурами еще более мелкими, чем хлоропласты, способны осуществлять реакции выделения кислорода и фотофосфорилирования. Однако следует здесь же указать, что с увеличением степени дезинтеграции устойчивость пигментов уменьшается. Так, например, в квантазомах каротиноиды и хлорофиллы претерпевают выцветание на свету и даже в темноте. Добавление к квантазомам стромы пластиды задерживает это выцветание.

Современные исследования показали, что образование макроэргических связей под действием световой энергии (фотосинтетическое фосфорилирование) имеет большое значение для осуществления цикла фотосинтетических реакций в зеленых пластидах и хроматофорах.

Различают два основных типа фотосинтетического фосфорилирования: циклический и нециклический. Для процесса фотосинтеза, сопровождающегося выделением кислорода, характерен нециклический тип фотосинтетического фосфорилирования.

В соответствии с существующими представлениями этот тип синтеза АТФ (аденозинтрифосфорная кислота) может осуществляться при сочетании двух фотохимических реакций. Первая из них приводит к образованию восстановленного ТПН (три-

фосфопиридин-нуклеотид); вторая реакция, сопряженная с фотоокислением воды, ведет к образованию макроэргических связей в молекуле АТФ.

Исследования последних лет позволяют высказать предположение, что процесс фотосинтетического фосфорилирования тесно связан как с зелеными, так и с желтыми пигментами. Это находится в соответствии со сказанным выше в этой главе о том, что в фотохимических реакциях пигменты фитохромопротеидного комплекса участвуют как интегральная фотосинтетическая единица.

Вполне возможно, что ксантофиллы, участвующие в переносе кислорода при фотоокислении воды, также играют какую-то роль в реакциях фотосинтетического фосфорилирования.



ГЛАВА V

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ПИГМЕНТОВ ПЛАСТИД

РАСПРОСТРАНЕНИЕ КАРОТИНОИДОВ В РАСТЕНИЯХ

Распространение по различным систематическим группам

Исследование содержания отдельных каротиноидов в различных группах растений позволяет обнаружить наличие определенной закономерности; существует определенная корреляция между систематическим положением данного вида, рода, семейства, класса и набором содержащихся в них пигментов. При этом создается впечатление, что среди низших организмов — бактерий и водорослей — наблюдается большее разнообразие каротиноидов, а у более высокоорганизованных классов можно видеть как бы более «упорядоченный» набор каротиноидов.

Группа растений	Каротиноиды
Бактерии.	α-, β-, γ-, σ-каротины, ликопин, коралин, лепротин, родопин, капсантин, астаксантин, криптоксантин, лютеин, родовиоласцин, родопурпурин, родовибрин, флавородин, зеаксантин, сарцинин, сарцинаксантин, рубиксантин, родоксантин, α- и β-бактериопурпурины, хризофлеин, астацин, азафрин, торулин, торулородин.
Грибы.	α-, β-, γ-, σ- и ζ-каротины, ликопин, нейроспорин, фитофлуин, фитоин, торулин, рубиксантин, родовиоласцин, родопин, родопурпурин, торулародин.
Водоросли.	α-, β-, γ- и υ-каротины, ликопин, сифоноксантин, тараксантин, виолаксантин, гематоксантин, лютеин, миксоксантин, афаницин, миксоксантофилл, зеаксантин, фукоксантин, сулькатоксантин, астаксантин, диадиноксантин, криптоксантин, диноксантин, диатоксантин, неоксантин.
Листья высших растений.	α- и β-каротины, лютеин, зеаксантин, виолаксантин и неоксантин.

Кроме упорядочения и отбора каротиноидов, у фотосинтезирующих организмов наблюдается появление каротиноидов, содержащих эпоксидные группы. Так, ни у бактерий, ни у грибов не встречаются такие каротиноиды, как виолаксантин или неоксантин. Между тем у водорослей и у высших растений, т. е. у растений, осуществляющих фотосинтез, можно обнаружить эти ксантофиллы. Этот эволюционный признак, по-видимому, связан с фотосинтетической функцией этих пигментов.

Распределение по органам высших растений

Подземные органы. Корнеплоды сахарной свеклы, брюквы, моркови, батата и клубни картофеля содержат целый ряд каротиноидов. Важнейшим источником каротиноидов из перечисленных растений являются корнеплоды моркови и батата. Основной каротиноид, содержащийся в корнеплодах моркови, — β-каротин. Наряду с этим главным пигментом в меньшем количестве в корнях моркови встречаются α- и γ-каротины, а также лютеин. В клубнях картофеля обнаружены небольшие количества виолаксантина, лютеина, ауроксантина и флавоксантина.

Некоторые сорта брюквы содержат ликопин.

Листья. Каротиноиды листьев находятся вместе с зелеными пигментами в пластидах — хлоропластах. Зеленая окраска хлорофиллов обычно маскирует желтый цвет каротиноидов, но в этиолированных, хлорозных или пестролистных растениях, а также в осенних листьях можно наблюдать окраску, характерную для каротиноидов.

Самым распространенным представителем каротинов является β-каротин; можно считать, что листья всех растений содержат этот пигмент. α-Каротин часто сопровождает в небольших количествах β-изомер, но не является его обязательным спутником. В листьях зеленых растений не были обнаружены ни ликопин, ни γ-каротин. Исключение составляют листья повилики; здесь γ-каротин является основным каротиноидным компонентом.

Лютеин является преобладающим ксантофиллом зеленых листьев. Здесь уместно обратить внимание на тот интересный факт, что лютеин является дигидрокси-α-каротином, в то время как преобладающим изомером в листьях является β-каротин, дигидроксипроизводным которого является зеаксантин. Ниже показано количественное соотношение различных ксантофиллов листьев зеленых растений.

Ксантофилл	Содержание, % от суммы ксантофиллов
Лютеин . .	60
Неоксантин .	18
Виолаксантин	18
Зеаксантин	2
Остальные .	2

Кора и древесина. Специальными работами было показано, что в коре и древесине многих растений содержатся те же каротиноиды, что и в листьях.

Плоды. Если в листьях основными каротиноидами являются β-каротин и лютеин, то в плодах эти пигменты отступают и имеют второстепенное значение. Окраска плодов огромного числа видов растений зависит от присутствия в них таких каротиноидов, как γ-каротин и ликопин.

Окраска томатов, мякоти арбузов, плодов шиповника, ягод брусники и целого ряда других видов растений вызвана именно этими пигментами.

Кроме этих двух пигментов, в плодах различных растений можно встретить представителей каротиноидов, гораздо более разнообразных, чем в листьях зеленых растений. Так, кроме встречающихся в листьях пигментов, плоды содержат еще σ-каротин, ζ-каротин, родоксантин, ликофилл, ликоксантин, рубиксантин, тараксантин, мутатохром, капсантин, целаксантин и антераксантин.

Цветочные лепестки. Окраска цветочных лепестков многих видов растений вызывается каротиноидами. Наряду с каротиноидами, встречающимися и в листьях, имеется ряд специфических для цветочных лепестков каротиноидов. При этом в цветках довольно часто ксантофиллы находятся в этерифицированном состоянии. Из специфических каротиноидов можно упомянуть следующие: эшшольксантин, петалоксантин, газанияксантин, ауроксантин, хризантемаксантин, рубихром, флавоксантин и др.

Пыльца и пыльники. В пыльниках и пыльце многих видов растений каротиноиды широко распространены.

Пыльца:
- Эфиры лютеина
- α- и β-каротины
- α-Каротин-эпоксид
- Лютеин-эпоксид
- Флавоксантин (следы)
- Лютеин (следы)

Пыльники:
- Эфиры лютеина
- Лютеин-эпоксид
- Каротин (следы)
- Антераксантин

Как правило, главным каротиноидным компонентом в пыльце являются эфиры ксантофиллов. Наряду с ними в пыльце и пыльниках встречаются эпоксиды лютеина.

РАСПРОСТРАНЕНИЕ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ ПИГМЕНТОВ В РАСТЕНИЯХ

Для всех растений, осуществляющих фотосинтез с выделением кислорода, характерно присутствие хлорофилла *a*. Этот пигмент содержится в клетках синезеленых, красных, бурых, диатомовых водорослей, а также в зеленых водорослях и высших зеленых растениях. В то же время хлорофилл *a* отсутствует у фоторедукторов, т. е. у бактерий, осуществляющих фотосинтез без выделения кислорода. У сернопурпурных бактерий в хроматофорах содержится пигмент бактериохлорофилл, а у серно-зеленых — бактериовиридин.

Хлорофилл *b* встречается у эвгленовых и зеленых водорослей и у высших зеленых растений (табл. 4).

Таблица 4

Распространение азотсодержащих пигментов в различных систематических группах растений

Группы растений	Хлорофиллы				Фикобилины	
		b		*d*	фикоэритрин	фикоцианин
Высшие зеленые	+	+	—	—	—	—
Водоросли зеленые	+	+	—	—	—	—
» бурые .	+	—	+	—	—	—
» красные .	+	—	—	+	+	+
» диатомовые	+	—	+	—	—	—
» синезеленые	+	Следы	—	—	+	+
Эвгленовые .	+	+	—	—	—	—

Подытоживая приведенные сведения по распространению пигментов, можно сказать, что для фотосинтезирующих групп растений, у которых процесс фотосинтеза связан с выделением кислорода, характерно присутствие двух пигментов — виолаксантина и хлорофилла *a*.



БИОСИНТЕЗ ПИГМЕНТОВ ПЛАСТИД

В зеленых листьях растений в течение всего вегетационного периода совершаются процессы разрушения и новообразования пигментов. Содержание пигментов в каждый данный момент является результирующей этих двух процессов: в случае преобладания процесса новообразования в листьях наблюдается увеличение количества пигментов, и, наоборот, если преобладает процесс разрушения, то количество пигментов уменьшается. Вопрос о биосинтезе из бесцветных предшественников имеет большое значение при исследовании пигментов пластид.

Биосинтез пигментов — очень сложный процесс, зависящий от целого ряда внешних факторов: температуры, света, минерального питания и др. Некоторые растения способны синтезировать в темноте как каротиноиды, так и хлорофилл; к таким растениям относятся водоросли, мхи, папоротники и голосемянные.

Подавляющее большинство видов покрытосемянных растений образуют каротиноиды в темноте, но неспособны зеленеть без света. В этиолированных проростках покрытосемянных содержатся каротиноиды и небольшие количества зеленого пигмента. До недавнего времени считалось, что этот пигмент является протохлорофиллом. Однако в последние годы было установлено наличие пигмента, не содержащего фитол, т. е. протохлорофиллида.

БИОСИНТЕЗ КАРОТИНОИДОВ

Общим характерным признаком для всех каротиноидов является то, что они построены из изопреновых единиц; углеродный скелет такой единицы изображен на рис. 33.

Каротиноиды принадлежат к группе природных соединений, известных под общим названием терпеноидов. По числу изопреновых остатков различают моно-, сескви-, ди-, три- и тетратер-

пены. Они содержат соответственно 2, 3, 4, 6 и 8 изопреновых остатков. Так как каротиноиды содержат 8 изопреновых остатков, то они относятся к классу тетратерпенов.

Было точно установлено, что тетратерпены образуются путем конденсации двух идентичных единиц, состоящих из двадцати углеродных атомов; при этом в отличие от дитерпенов, которые образуются из изопреновых остатков путем последовательного присоединения «головы» одного из них к «хвосту» другого вдоль всей молекулы, конденсация двух молекул дитерпена с образованием тетратерпена совершается таким образом, что рядом оказываются «хвосты» двух молекул.

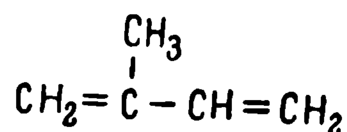


Рис. 33. Структурная формула изопрена.

При рассмотрении вопроса о биосинтезе молекулы каротиноидов приходится учитывать следующие моменты: а) образование пятичленного остатка, б) характер полимеризации этих остатков, в) механизм конденсации двух дитерпенов в молекулу тетратерпена, образование циклов на концах молекулы, образование системы конъюгированных двойных связей и г) происхождение кислородных атомов в гидроксильных и эпоксидных группах.

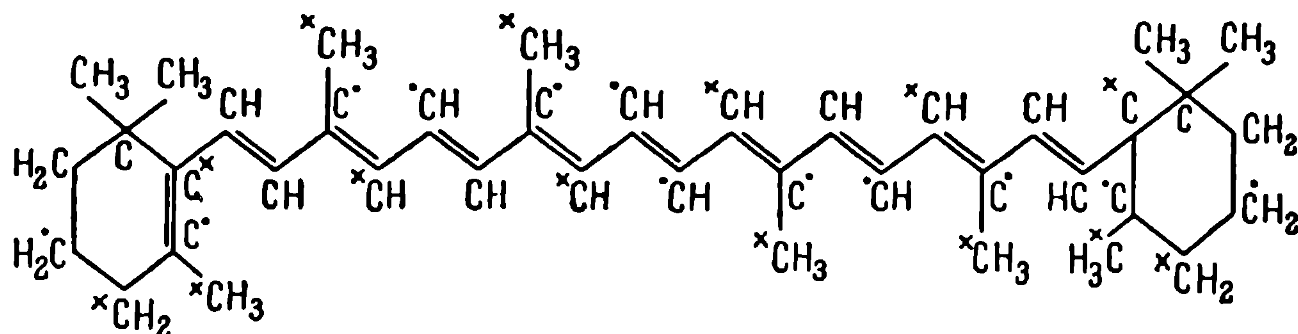


Рис. 34. Распределение метки C^{14} в β-каротине.

Крестиком помечены атомы углерода C^{14} в метильной группе, *точкой* — в карбоксильной.

Образование пятичленного остатка. Плесневой гриб *Mucor hiemalis* является удобным объектом для изучения этого вопроса, так как он способен синтезировать β-каротин, используя ацетат в качестве единственного источника углерода. При выращивании этого гриба на ацетате C^{14}, в котором метка находилась либо в метильной, либо в карбоксильной группе, получали каротин, меченный определенным образом (рис. 34).

Далее было установлено, что мевалоновая кислота (рис. 35) может заменить ацетат при синтезе каротина. При декарбоксилировании мевалоновой кислоты получается изопентил-пирофосфат, т. е. соединение, имеющее пять углеродных атомов (рис. 36).

На основании современного уровня знаний мы можем с большой долей вероятности изобразить путь синтеза пяти-

членного остатка при биосинтезе каротиноидов в виде следующей схемы: ацетат → мевалоновая кислота → изопентенил-пирофосфат.

Полимеризация изопентенил-пирофосфата. В настоящее время еще экспериментально не установлено, каким образом происходит полимеризация изопентенил-пирофосфата в соединение с двадцатью атомами углерода. Однако по аналогии с образованием тритерпена — сквалена можно считать, что она идет путем постепенного присоединения «хвостовой части» одной молекулы изопентенил-пирофосфата к «головной части» другой молекулы этого соединения.

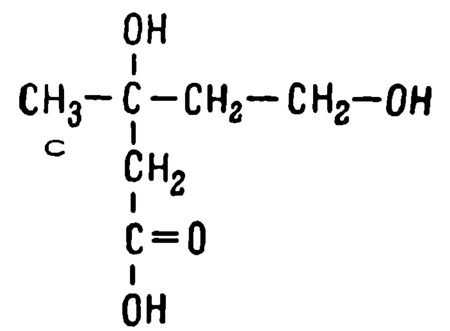


Рис. 35. Структурная формула мевалоновой кислоты.

Механизм конденсации двух дитерпенов. Считается, что геранил-геранил является тем двадцатиуглеродным соединением, димеризацией которого получается тетратерпен, являющийся предшественником всех каротиноидов, подобно тому, как сквален является предшественником всех стероидов. Но если строение сквалена хорошо изучено, то о природе сорокауглеродного предшественника каротиноидов еще нет единого мнения.

Вместе с тем на основании целого ряда исследований, произведенных на плодах, можно считать, что образование двойных связей идет ступенчато через следующие промежуточные соединения: декагидроликопин → фитоин → фитофлуин → ζ-каротин → → протетрагидроликопин → нейроспорин → ликопин.

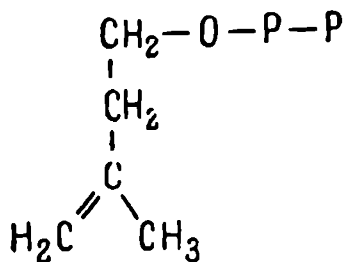


Рис. 36. Структурная формула изопентенил-пирофосфата.

Вопрос о механизме замыкания цикла в настоящее время еще не решен. Можно лишь указать на то, что в отличие от тритерпенов, в которых замыкание цикла совершается путем внедрения гидроксильной группы, предшественниками кислородсодержащих каротиноидов — ксантофиллов — являются ненасыщенные углеводороды — каротины.

Внедрение гидроксильного и эпоксидного кислорода в молекулу каротиноида. Опытами, проведенными с помощью тяжелого изотопа O^{18}, было показано, что при биосинтезе ксантофиллов источником гидроксильных кислородов является молекулярный кислород, а источником эпоксидных кислородов является вода.

Подытоживая, можно сказать, что современная наука достигла больших успехов в исследовании вопроса о биосинтезе каротиноидов. Несмотря на то, что целый ряд этапов биосинтеза еще остается неизвестным, постепенно вырисовывается картина

биосинтеза этих пигментов из такого низкомолекулярного соединения, как ацетат.

В общем путь биосинтеза каротиноидов таков: ацетат → мевалоновая кислота → изопентенил-пирофосфат → тетратерпен (геранил-геранил) → фитоин → ликопин → каротины → ксантофиллы.

БИОСИНТЕЗ ХЛОРОФИЛЛОВ

Биосинтез хлорофилла складывается из нескольких этапов. Первый этап состоит из ряда реакций, в результате которых из низкомолекулярных органических веществ образуются структурные единицы, лежащие в основе порфиринов, — пиррольные кольца; второй этап заключается в образовании тетрапиррола; третий этап складывается из ряда превращений, приводящих к образованию магний-винил-феопорфирина (протохлорофиллида); четвертый состоит в восстановлении двойной связи в четвертом пиррольном кольце с образованием хлорофиллида; наконец, пятый этап состоит в образовании фитилового эфира хлорофиллида, т. е. хлорофилла *a*. Окисление хлорофилла *a* приводит к образованию хлорофилла *b*.

Следует оговориться, что многие из перечисленных этапов исследованы лишь в самом общем виде. Детальное изучение реакций, в результате которых происходит биосинтез хлорофилла, является делом будущего.

В настоящее время установлено, что теми низкомолекулярными соединениями, из которых образуется пиррольное кольцо, являются уксусная кислота и глицин. При помощи меченых атомов (C^{14} и N^{15}) показано, что при синтезе хлорофилла в растениях используются α-атомы уксусной кислоты и гликоколя.

ГЛАВА VII

ПОДГОТОВКА МАТЕРИАЛА К АНАЛИЗУ

Подготовка материала к анализу заключается в следующем ряде операций: 1) фиксация, 2) взятие навески, 3) измельчение материала и 4) нейтрализация материала. Можно фиксацию материала производить и после взятия навески.

ФИКСАЦИЯ (КОНСЕРВИРОВАНИЕ) МАТЕРИАЛА

Ниже будет описано несколько способов фиксации растительного материала; выбор того или иного способа фиксации будет зависеть от задачи, которая стоит перед исследователем, а также от тех условий, в которых производится работа. Некоторые способы фиксации весьма просты и могут быть проведены в любых условиях, вплоть до условий полевой лаборатории, а некоторые из них требуют очень сложной аппаратуры и могут быть выполнены лишь в хорошо оборудованной лаборатории.

Способы фиксации можно разделить на мгновенные (практически) и на более или менее длительные.

Мгновенные способы фиксации

Фиксация пониженной температурой

Фиксация охлажденным ацетоном. Ацетон охлаждается в сосуде Дьюара кусочками сухого льда (твердой CO_2). Во избежание вспенивания ацетона сухой лед необходимо добавлять в сосуд небольшими порциями. Необходимо следить за тем, чтобы на дне сосуда всегда был сухой лед; пока в сосуде имеется сухой лед, ацетон годится для мгновенной фиксации. В зависимости от соотношения твердой и жидкой фазы в сосуде температура может несколько колебаться; минимальная температура —78°. При погружении растительного материала (листа, диска, высеченного из листа, и т. п.) в охлажденный ацетон происходит очень быстрое переохлаждение тканей, сопровождающееся инактивацией ферментов. В таком состоянии растительный материал

может быть законсервирован в течение довольно длительного времени. В нашей лаборатории удавалось сохранять диски, высеченные из листьев, в течение недели. Для удобства выполнения последующих операций рекомендуется в сосуд Дьюара погрузить подвешенный на проволочках фарфоровый стаканчик, в дне которого проделывается небольшое отверстие. Через это отверстие в стаканчик поступает охлажденный ацетон; дальнейшее манипулирование с материалом, подлежащим анализу, облегчается благодаря тому, что его не нужно отделять от сухого льда.

Фиксация охлажденным петролейным эфиром. При постановке определенных задач возникает необходимость предварительной экстракции пигментов неполярным растворителем. В этих случаях нежелательна фиксация в таком полярном растворителе, каким является ацетон; мы применяли для фиксации листьев вместо ацетона петролейный эфир. Вся процедура остается той же, но следует обратить внимание на необходимость соблюдения крайней осторожности при работе с большими количествами петролейного эфира, так как он огне- и взрывоопасен.

Фиксация охлажденным спиртом. При работе с охлажденным спиртом следует помнить, что в нем содержится около 5% воды. Поэтому рекомендуется работать только с абсолютным спиртом. Методика фиксации аналогична применяемой при работе с ацетоном.

Фиксация жидким воздухом (жидким кислородом). В лабораториях, обеспеченных жидким кислородом, можно пользоваться им для фиксации растительного материала.

В предварительно охлажденную ступку (фарфоровую) наливают из баллона жидкий воздух; фиксация производится простым погружением листьев или дисков в жидкость. Хранить в жидком воздухе фиксированный материал можно лишь в течение нескольких минут.

Сочетая фиксацию в жидком воздухе с последующим хранением в охлажденном ацетоне, можно получить весьма хорошие результаты.

Фиксация высокой температурой

Фиксация в воде и водных растворах. Для фиксирования листьев достаточно их опустить в высокий стакан с кипящей водой; удобней всего это сделать, если предварительно поместить листья в кусочек марли. Время фиксации следует менять в зависимости от характера листьев; обычно хороший результат можно получить при кипячении листьев в течение 30 сек.—1 мин. Если листья имеют очень жесткий эпидермис, время кипячения можно продлить до 2 мин. Нужно всегда иметь в виду, что листья, клеточный сок которых имеет кислую реакцию, можно фиксиро-

вать таким образом лишь в тех случаях, когда феофитинизация не мешает решению задачи; для определения каротиноидов так фиксировать нельзя.

После кипячения нужно пинцетом вытащить марлю с листьями и подставить ее под струю холодной воды из водопровода. В случае, если нет водопровода, можно марлю с листьями погрузить в большой кристаллизатор с холодной водой для быстрого охлаждения материала. После этого нужно подсушить листья фильтровальной бумагой, а затем окончательно высушить на воздухе в темной комнате или в темном шкафу.

Для фиксации листьев с кислым клеточным соком необходимо вместо воды пользоваться водным раствором буфера; мы пользуемся фосфатным буфером при pH=10. Для листьев с очень кислым клеточным соком употребляют буфер с pH=11—12.

Следует указать, что при фиксации высокой температурой происходят некоторые потери каротиноидов (до 10%). Поэтому такой метод фиксации нельзя рекомендовать для работ по выяснению механизма участия каротиноидов в фотосинтезе. В то же время для определения, например, сравнительного содержания хлорофиллов *a* и *b* или суммы хлорофиллов такая фиксация вполне допустима.

Фиксация горячим паром и сухим воздухом. В тех случаях, когда клеточный сок листьев имеет pH=7 или близкий к этой величине, можно рекомендовать фиксацию материала горячим паром. Опытным путем проверяют в аппарате Коха, как пигменты данного растения переносят обработку горячим паром; об этом можно судить по свеже-зеленой окраске, сохраняющейся в листьях, а также по контрольной хроматограмме (см. главу IX).

Высушенный в темноте после обработки горячим паром материал может храниться в эксикаторе очень долгое время — в течение месяцев.

Существует способ фиксации листового материала при помощи горячего воздуха — топочным газом; этот способ применяется при промышленном получении пигментов.

Некоторые специальные способы фиксации

К мгновенным способам фиксации материала следует отнести и особый, весьма сложный способ, получивший название «лиофильной сушки». Лиофильная сушка основана на свойстве льда возгоняться, т. е. превращаться в газообразное состояние, минуя состояние жидкой фазы. Для осуществления лиофильной сушки созданы многочисленные модели приборов и аппаратов, один из которых мы здесь опишем (рис. 37).

Прибор состоит из двух частей — круглодонной широкогорлой колбы и пришлифованного к ней конденсора, в котором

имеется отводная трубка, присоединяемая к форвакуумному насосу. Подлежащий высушиванию материал помещается в круглодонную колбу и замораживается погружением колбы в жидкий воздух или охлажденный ацетон. Не давая материалу оттаять, колбу соединяют с конденсором таким образом, чтобы имеющееся на горле колбы отверстие приходилось против отверстия отводной трубки конденсора. Масляным форвакуумным насосом в системе создается вакуум (0.01 мм рт. ст.), после чего, повернув колбу вокруг вертикальной оси на 90°, отключают прибор от насоса и погружают конденсор в охлаждающую жидкость. Созданная таким образом разность температур в конденсоре и в колбе с высушиваемым материалом позволяет высушить материал при комнатной температуре. Такой способ сушки не вызывает ни денатурации белков, ни инактивации ферментов, поэтому он пригоден для работ, в которых изучаются пигменты наряду с ферментами, как например при исследовании реконструированных систем.

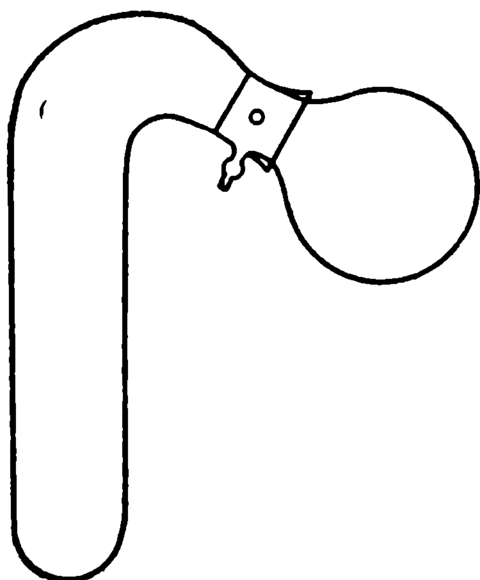


Рис. 37. Прибор для лиофильной сушки.

Мы описали те способы фиксации, которые следует применять в случае необходимости анализировать все пигменты — и желтые, и зеленые. Однако при решении ряда вопросов возникает потребность в определении либо только зеленых, либо только желтых пигментов. В частности, для фиксации материала на определение количества зеленых пигментов можно рекомендовать обработку листьев растворами уксусной или щавелевой кислоты. С этой целью 5%-е растворы этих кислот помещают в фарфоровый стаканчик, нагревают до 80—90° и погружают в него листья. Происходит быстрое побурение листьев вследствие образования феофитина. Феофитинизированные листья можно сохранять очень долгое время; определять хлорофиллы можно и по феофитинам по специальной калибровочной кривой (см. главу X).

Способы фиксации, требующие длительного времени

Высушивание на воздухе

Самым простым способом фиксации является высушивание листьев на воздухе. Для этого надо листья расположить в один слой на листы фильтровальной бумаги в темной комнате. Если нет темной комнаты, то нужно предохранить листья от действия прямого, яркого света. Такая сушка может длиться в зависимости от содержания влаги в листьях 3—4 дня. За это время в листьях могут происходить самые различные ферментативные про-

цессы. Некоторые виды растений при такого рода сушке теряют хлорофилл в большей или меньшей степени, вплоть до полного пожелтения. Хорошо переносят такую сушку листья крапивы. При препаративном получении хлорофилла можно пользоваться листьями крапивы, высушенными этим способом.

Высушивание в вакуум-эксикаторе

Можно сократить период сушки при комнатной температуре, если помещать материал в вакуум-эксикатор. В вакуум-эксикаторе листья хорошо высушиваются за 48 час.

Высушивание сернокислым натрием

Безводный сернокислый натрий жадно поглощает капельно-жидкую воду. Если растирать листья в ступке с сернокислым натрием, то можно получить хорошо высушенный порошок, в котором пигменты сохраняются, а ферменты инактивируются вследствие обезвоживания. Количество сернокислого натрия превосходит количество листьев в 10 раз (по весу). Этот способ имеет ряд преимуществ. Во-первых, при работе по этому способу совмещаются две операции — фиксация и измельчение; во-вторых, этот метод позволяет извлечь каротин при помощи неполярного растворителя (см. главу VIII).

Фиксирование материала омылением щелочью на холоду

Этот способ можно применять, если нужно анализировать только желтые пигменты.

Для фиксации материала по этому способу растирают листья при комнатной температуре с 30%-й спиртовой щелочью. Полученные экстракты сохраняют в запаянных пробирках.

Способов фиксации очень много, и каждый из них служит той или иной цели. Поэтому в соответствии с поставленной задачей можно выбирать тот или иной способ, а также их комбинацию.

ВЗЯТИЕ НАВЕСКИ

При взятии навески нужно принимать во внимание два важных условия: величину навески и скорость взятия навески.

Величина навески

Величина навески зависит от содержания в исследуемом материале пигментов. Так, например, при исследовании пигментов в этиолированных проростках необходимо брать навеску раз-

мером больше грамма — 1.5—2 г; с другой стороны, для изучения содержания пигментов в лиофильно высушенных хлоропластах достаточно взять в сто раз меньшие количества — 20 мг.

Величина навески равным образом зависит от объема раствора получающейся вытяжки.

При работе с нормальными зелеными листьями достаточно взять навеску в 0.3—0.5 г.

В некоторых работах приходится вести сравнительный расчет содержания пигментов не только на единицу веса, но и на единицу поверхности. В этом случае необходимо пользоваться высечками и взвешивать определенную площадь.

Скорость взятия навески

При взятии навески из фиксированного материала можно брать навеску на аналитических весах, так как за время взятия навески в материале не произойдет заметных изменений. Если же взятие навески предшествует фиксации, то навеску надо делать быстро, и поэтому необходимо пользоваться торзионными весами. В тех случаях, когда расчет ведется и на единицу площади, необходимо взвешивать каждый диск отдельно на торзионных весах и после взвешивания немедленно фиксировать. Таким образом, если навеска состоит из 10 дисков, то нужно сделать 10 отдельных взвешиваний на торзионных весах. Это несколько удлиняет срок взятия *всей* навески, но зато обеспечивает ее хорошую фиксацию.

В тех случаях, когда нет ни аналитических, ни торзионных весов, можно пользоваться и техническими, но следует всегда учитывать, что из-за меньшей чувствительности технических весов для достижения большей точности необходимо увеличить навеску до 5—6 г (в расчете на сырой вес).

ИЗМЕЛЬЧЕНИЕ И НЕЙТРАЛИЗАЦИЯ МАТЕРИАЛА

Для быстрой и полной экстракции пигментов (см. главу VIII) необходимо хорошо измельчить материал. Измельчение материала (листьев) необходимо также при получении изолированных хлоропластов.

Измельчение зафиксированного и высушенного материала не представляет больших трудностей. При небольших порциях оно производится путем растирания в фарфоровой ступке; если же количество подлежащего растиранию материала велико, как это бывает при получении препаратов, то следует измельчать его на мельнице. Лучше пользоваться шаровой мельницей с фарфоровыми шарами.

Измельчая зафиксированный, но невысушенный материал, необходимо соблюдать осторожность, так как клеточный сок

может подкислить реакцию среды, что приводит к феофитинизации (частичной) хлорофиллов, а также к потере части каротиноидов.

Избежать подкисления среды можно добавлением нейтрализующих веществ: мела, соды и др.

Для облегчения растирания к материалу следует добавлять небольшое количество чистого кварцевого песка или толченого стекла. Можно сочетать растирание с фиксированием материала; так, при растирании листьев с безводным сернокислым натрием сочетаются фиксация и измельчение.

В некоторых случаях, когда нежелательно добавление к материалу каких-либо порошковидных тел, нейтрализацию при измельчении можно производить путем добавления к нему капли насыщенного раствора двууглекислой соды.

Свежий и нефиксированный материал можно измельчать в особых приборах — гомогенизаторах.



ГЛАВА VIII

ЭКСТРАКЦИЯ ПИГМЕНТОВ

Существует большое число способов экстракции. Для систематизации изложения мы постараемся дать классификацию этих способов.

По роду поставленной задачи можно разделить экстракцию на полную и частичную.

В зависимости от характера и природы материала, подлежащего анализу, экстракции могут подвергаться целые листья, как свежие, так и фиксированные, одноклеточные водоросли, суспензия хлоропластов или раствор пигментов в органическом растворителе.

От химического строения растворителя зависит величина его дипольного момента, а следовательно и степень полярности растворителя; можно производить экстракцию полярными или неполярными растворителями, а также смесью полярного и неполярного растворителя.

Таким образом, обобщая сказанное выше, можно прийти к выводу, что при выборе того или иного способа экстракции нужно руководствоваться тремя условиями: поставленной задачей, характером материала и природой растворителя.

Так как пигменты в листе связаны с липопротеинами (глава IV), то полную экстракцию можно произвести лишь после нарушения этой связи. Неполярные растворители не нарушают связи хлорофиллов с белками, поэтому для полного извлечения пигментов из свежих листьев необходимо применять либо полярные растворители, либо смесь полярного растворителя с неполярным. Из наиболее часто применяющихся полярных растворителей известны ацетон и этанол. Чистый ацетон при комнатной температуре легко извлекает из хорошо измельченных свежих листьев все пластидные пигменты. В некоторых случаях (например, при получении хлорофиллида из свежих листьев борщевика) ацетоном заливают листья без предварительного измельчения; при этом не происходит полного извлечения пигментов.

Аналогично ацетону действует и этанол. При работе с радиоактивным углеродом возникает необходимость фиксации материала горячим спиртом. Такая фиксация приводит к частичному извлечению пигментов; полное извлечение может быть достигнуто лишь при длительном кипячении в спирте или при тщательном измельчении материала.

Для получения прозрачного раствора пигментов в экстрагирующем растворителе нужно отделить жидкую фазу от твердой, которая состоит обычно из мезги, стеклянного порошка и нейтрализующих агентов. Лучше всего это достигается путем фильтрования через фильтр из пористого стекла. Полученный фильтрат доводится до метки в мерной колбочке или мерном цилиндре.

Из фиксированного материала извлечение пигментов производится легче, чем из свежего; все же для полноты экстракции лучше и фиксированный материал экстрагировать полярным растворителем (спиртом, ацетоном).

В некоторых случаях, когда поставлена задача извлечь из листьев только каротин, следует производить экстракцию неполярным растворителем: гексаном, петролейным эфиром или бензином. Неполярные растворители не нарушают связи хлорофиллов и ксантофиллов с белками и поэтому не могут их извлечь из свежих листьев. Непрочная связь каротина с белками нарушается этими растворителями, и он извлекается ими. Листья некоторых видов растений богаты эфирными маслами, смолами и другими поверхностноактивными веществами; эти вещества растворяются в неполярном растворителе и способствуют частичной денатурации белка, что приводит к извлечению небольших количеств хлорофиллов из листьев. Особенное значение имеет чистота петролейного эфира.

Применяя последовательно после неполярного растворителя полярный, можно произвести дробную экстракцию пигментов. Так, если к остатку после извлечения каротина прибавить спирт или ацетон или смесь их, то можно сочетать таким приемом экстракцию с разделением.

Экстракция пигментов из одноклеточной водоросли затруднена тем обстоятельством, что окружающий клетку слизистый слой сильно затрудняет проникновение растворителя в клетку. Для обеспечения лучшего проникновения растворителя необходимо нарушить целостность клеточной оболочки. Это достигается тем, что отцентрифугированные при 3000—4000 оборотах ($\approx$1000 g) в течение 5 мин. клетки суспендируются в небольшом количестве метанола или другого полярного растворителя.

Полученная суспензия водорослей растирается в фарфоровой ступке со стеклянным песком или другим порошковидным веществом (тальк, алюмогель, безводный сернокислый натрий). Порошковидное вещество берется в 10—15-кратном по объему количестве по отношению к объему суспензии.

Водоросли растираются в течение 3—6 мин. до полного испарения метанола. Полученный порошок переносится на стеклянный фильтр (№№ 3 и 4) и заливается небольшой порцией растворителя. После 3—4-кратной экстракции водоросли становятся совершенно бесцветными.

В. Н. Любименко было показано, что дистиллированная вода извлекает из листьев некоторых растений (аспидистра, функия) весь хлорофилл-белково-липоидный комплекс.

Если вместо чистой воды применять водный раствор детергентов, то можно извлечь фитохромопротеидный комплекс из многих видов растений. Эту способность дегергентов растворять фитохромопротеидный комплекс удалось применить для количественного определения хлорофилла.

При решении некоторых задач можно применять для экстракции смесь полярного и неполярного растворителей. Так, если растирать листья растений петролейным эфиром, к которому добавлено 2—3% этанола, то происходит полная экстракция пигментов.

Извлечение пигментов из изолированных хлоропластов совершается так же, как и из целых листьев. Разница заключается лишь в том, что растворители хорошо извлекают пигменты из изолированных хлоропластов и без растирания с порошковидными телами. Если расположить различный растительный материал по степени убывающей трудности извлечения из него пигментов, то на первом месте будет стоять хлорелла, на втором — листья и на третьем — хлоропласты.

Когда хотят извлечь пигменты из предварительно высушенного материала с препаративными целями, необходимо или желательно предварительно экстрагировать его 45—50%-м ацетоном. Такой раствор ацетона извлекает большое количество водорастворимых примесей, что облегчает дальнейшее извлечение пигментов чистым ацетоном.

ГЛАВА IX

КАЧЕСТВЕННОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ ПИГМЕНТОВ

Полученный полный экстракт пигментов из исследуемого материала используют для разделения на индивидуальные компоненты или для выделения одного из компонентов.

Разделение или, соответственно, выделение отдельных компонентов из экстракта может иметь целью либо количественное определение, либо идентификацию, либо препаративное получение. В соответствии с поставленной исследователем задачей могут быть применены различные способы разделения пигментов.

Способы разделения пигментов основаны на использовании несмешивающихся растворителей или на хроматографии, а также на комбинации этих двух приемов.

СПОСОБЫ РАЗДЕЛЕНИЯ, ОСНОВАННЫЕ НА ИСПОЛЬЗОВАНИИ НЕСМЕШИВАЮЩИХСЯ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

При работе с органическими растворителями можно всегда подобрать такую пару, чтобы они не растворялись друг в друге, или если и растворялись, то в очень незначительных количествах. В качестве примера можно привести такие пары растворителей: 80%-й метиловый спирт—петролейный эфир; водный ацетон—петролейный эфир; этиловый эфир—этанол, и т. п. При сливании растворителей каждой пары происходит их расслоение на две фазы — верхнюю (эпифаза) и нижнюю (гипофаза). В соответствии с этим растворитель может быть эпифазным либо гипофазным в зависимости от его удельного веса. Так, например, спирт в паре с этиловым эфиром будет гипофазным, а в паре с хлороформом тот же этанол будет эпифазным.

Разделение пигментов при помощи несмешивающихся растворителей основано на различном сродстве их к тому или иному растворителю, а следовательно, на лучшей растворимости того или иного пигмента в различных растворителях. Каротин, яв-

ляющийся углеводородом, имеет сродство к растворителям типа гексана, петролейного эфира, бензина и т. п. Кислородсодержащие каротиноиды — ксантофиллы — лучше растворимы в спиртах.

Если к спиртовой вытяжке всех пигментов добавить равный объем петролейного эфира (или бензина), а затем встряхнуть делительную воронку или пробирку, то пигменты распределятся между двумя фазами — в эпифазе будут растворены хлорофиллы и каротин, а в гипофазе — ксантофиллы («реакция Крауса»).

Используя ряд приемов и операций, можно с помощью несмешивающихся растворителей разделить те или иные пигменты, а также выделить тот или иной пигмент.

При работе с несмешивающимися растворителями экспериментатор может встретиться с необходимостью совершить следующие операции.

Перевод всех пигментов из гипофазы в эпифазу

В качестве примера можно рассмотреть тот случай, когда желательно перевести пигменты из ацетона в петролейный эфир. В зависимости от способа приготовления экстракта ацетон может быть чистым или может содержать и некоторое количество воды. В первом случае перевод в эпифазу осуществляется проще, чем во втором. Рассмотрим ход операций в обоих случаях.

К отмеренному объему раствора всех пигментов в чистом ацетоне добавляется в делительной воронке равный объем петролейного эфира. Смесь встряхивается; при этом образуется однофазная система — раствор пигментов в смеси двух растворителей, так как петролейный эфир и чистый ацетон смешиваются друг с другом. Осторожным прибавлением воды путем подливания ее вдоль стенки вызывают расслоение смеси на две фазы — гипофазу, состоящую из водного ацетона, не содержащую пигментов, и эпифазу, состоящую из раствора пигментов в петролейном эфире.

Для перевода пигментов из водного ацетона в петролейный эфир недостаточно просто прибавить петролейный эфир к ацетоновой вытяжке, так как водный ацетон не смешивается с петролейным эфиром. Поэтому для осуществления перевода пигментов из водного ацетона необходимо добавлять в гипофазу поваренную соль. Количество добавляемой поваренной соли должно быть таким, чтобы в результате ее растворения образовался 10%-й раствор. В присутствии соли пигменты из водного ацетона полнее переходят в петролейный эфир.

Аналогично поступают при работе с пигментами, когда необходимо перевести их из водного спирта в этиловый эфир.

Извлечение пигментов гипофазным растворителем из эпифазного

После того как все пигменты переведены в эпифазный растворитель, может быть осуществлена следующая операция — извлечение из смеси части пигментов гипофазным растворителем. Для этого подбирают такой гипофазный растворитель, который обладает свойством растворять часть пигментов и не смешивается с эпифазным растворителем. Так, например, если пигменты были переведены в петролейный эфир, то можно в качестве гипофазного растворителя взять 80%-й метиловый спирт. 80%-й метанол не смешивается с петролейным эфиром, поэтому после встряхивания этих двух растворителей в делительной воронке происходит быстрое расслоение на 2 фазы. В верхней фазе остаются каротин и хлорофиллы, а метанолом извлекаются ксантофиллы — лютеин, виолаксантин и неоксантин.

Отделение хлорофиллов от каротина

Содержащиеся в петролейном эфире каротин и хлорофилл можно разделить благодаря тому, что хлорофиллы совершенно не растворяются в чистом петролейном эфире. Промывая водой петролейно-эфирный раствор каротина и хлорофиллов, можно удалить весь метанол. Когда последние следы метанола отмываются от петролейного эфира, происходит выпадение хлорофиллов из раствора в виде мелко диспергированного осадка: раствор становится мутным, теряется флуоресценция, и после длительного стояния хлорофиллы собираются в осадок. Для ускорения процесса отделения хлорофиллов встряхивают в делительной воронке полученную суспензию с тальком, после чего фильтруют раствор каротина в петролейном эфире через небольшой слой талька (1—2 см). Хлорофилл отделяется на тальке в виде черного слоя. Фильтрат содержит раствор каротина в петролейном эфире.

Как видно из вышеприведенного описания, с помощью ряда несложных операций оказывается возможным разделить совокупность пигментов пластид на три группы: ксантофиллы, хлорофиллы и каротины.

Сочетание использования несмешивающихся растворителей с химическими воздействиями

Для решения некоторых задач можно применить предварительное омыление хлорофиллов с последующим использованием несмешивающихся растворителей. Различают два случая: пигменты находятся в гипофазе и пигменты находятся в эпифазе.

В первом случае после омыления предстоит перевести пигменты в эпифазный растворитель, а во втором случае необходимо отмыть эпифазный растворитель от продуктов омыления.

Омыление осуществляется в делительной воронке с помощью спиртовой щелочи. Каротиноиды, переведенные после омыления в эпифазный растворитель, разделяются на ксантофиллы и каротин с помощью несмешивающихся растворителей.

СПОСОБЫ РАЗДЕЛЕНИЯ, ОСНОВАННЫЕ НА ХРОМАТОГРАФИИ

Различают хроматографию на колонке и на бумаге. Разделение пигментов с помощью хроматографии основано на способности различных адсорбентов по-разному адсорбировать те или иные пигменты. По адсорбционной способности различают три вида адсорбентов: слабые, средние и сильные. К слабым адсорбентам относятся крахмал, сахароза и целлюлоза; к средним — силикагель, а к сильным — окись магния и окись алюминия. Для разделения пигментов, сильно отличающихся по своему химическому строению, можно применять слабые и средние адсорбенты, а для разделения изомеров необходимо применять сильные адсорбенты.

Хроматографическое разделение пигментов на колонке производится следующим образом. Адсорбентом заполняется длинная стеклянная трубка, и раствор пигментов фильтруется через столбик адсорбента. Отдельные пигменты распределяются в соответствии с их химическим строением и физическими свойствами на разных уровнях колонки. Так, например, высушенный петролейноэфирный раствор пигментов, фильтруясь через колонку из сахарозы, дает такую картину распределения пигментов: самым верхним пигментом остается неоксантин, ниже его располагается хлорофилл *b*, еще ниже — хлорофилл *a*, затем идут виолаксантин и лютеин. Каротин проходит вместе с растворителем, не адсорбируясь.

Разделенные таким образом пигменты могут быть отделены вместе с адсорбентом с колонки, после чего они элюируются с помощью таких растворителей, как спирт, ацетон или этиловый эфир. Частным случаем адсорбционной хроматографии является хроматография на бумаге. Сохраняя все положительные свойства адсорбционной хроматографии, хроматография на бумаге обладает целым рядом преимуществ перед хроматографией на колонке. Так, например, пигменты могут быть нанесены на бумагу из гипофазного растворителя, т. е. из растворителя, зачастую содержащего воду. Кроме того, на бумаге можно сделать двухмерную хроматограмму. Важным обстоятельством является то, что хроматография на бумаге может быть использована в качестве микрометода исследования пигментов. Эти пре-

имущества делают хроматографию на бумаге незаменимым орудием в руках экспериментатора.

Разделение пигментов с помощью хроматографии на бумаге осуществляется следующими операциями.

Нанесение пигментов на бумагу

Для получения одномерной хроматограммы не имеют значения ни величина, ни форма наносимого пятна. В этом случае можно наносить пипеткой раствор пигментов на прямоугольный лист бумаги в виде кружочка или полоски на расстоянии 1—2 см от нижнего края листа бумаги. Если пигменты наносятся из петролейного или этилового эфира, т. е. из эпифазных безводных растворителей, то эти растворители легко испаряются и нет необходимости в дополнительном подсушивании бумаги. Если же пигменты наносятся из водного спиртового или ацетонового раствора, то возникает необходимость в ускорении испарения растворителя. Это достигается струей воздуха, направляемой вентилятором на лист бумаги.

Разгонка пигментов по бумаге, получение хроматограммы

Применяя различные растворители и их сочетание, можно по желанию получить на хроматограмме любое расположение пигментов. Для разгонки бумажный лист с нанесенными на него пятном или полоской свертывается в виде полого цилиндра и помещается в банку, на дно которой наливаются небольшим слоем отдельные растворители или их комбинации. Растворитель, поднимаясь вверх по бумаге, увлекает за собой пигменты, распределяя их на разных уровнях бумажного листа. Если в качестве растворителя взять чистый петролейный эфир, то он из пятна извлекает один лишь каротин, который движется вместе с фронтом растворителя. Смесь петролейного эфира с бензолом извлекает из пятна все пигменты и дает своеобразную картину их распределения. Как и в первом случае, каротин движется вместе с фронтом растворителя. За ним, несколько отставая, идет лютеин. Еще больше отставая, движется виолаксантин. Хлорофиллы *a* и *b* распределяются над стартовым пятном, но не отделяются друг от друга — хлорофилл *b* располагается ближе к стартовому пятну, а хлорофилл *a* ближе к виолаксантину. Под хлорофиллом *b* находится маскируемый им ксантофилл неоксантин.

Применяя для разгонки смесь растворителей, состоящую из бензола, петролейного эфира и этанола, можно отделить неоксантин от остальных пигментов. Эта смесь растворителей извлекает все пигменты из стартового пятна, и все они, за исключением

неоксантина, идут за фронтом растворителя. Неоксантин отстает на 1—2 см от остальных пигментов. Смесь петролейного эфира с этанолом позволяет разделить хлорофиллы *a* и *b*.

Для полного разделения пигментов пластид на бумаге необходимо применять двухмерную хроматографию. Для осуществления двухмерной хроматограммы необходимо стартовое пятно нанести в виде небольшого кружочка в нижнем левом углу прямоугольного листа бумаги. При двухмерном хроматографировании производится последовательная разгонка пигментов сначала в одном направлении, а затем в направлении, перпендикулярном к первому. В первом направлении разгонка производится в смеси бензола с петролейным эфиром. Во втором направлении разгонку производят после перенесения хроматограммы в другую банку со смесью спирта с петролейным эфиром.

При операциях нанесения и разгонки не происходит заметных потерь пигментов. Если же оставить разогнанную хроматограмму на воздухе в течение более или менее длительного времени, то на бумаге может происходить значительная потеря каротиноидов. Поэтому необходимо по возможности сократить время от момента изъятия хроматограммы из банки, где она находилась в парах растворителя, до момента элюции ее растворителем. После того как пигменты четко отделились друг от друга, полученную хроматограмму вынимают из сосуда, дают испариться растворителю и разрезают ее на узкие полоски в соответствии с положением каждого пигмента. Отдельные полоски обрабатываются смесью спирта с ацетоном, благодаря чему пигменты переходят в раствор. Для лучшей элюции пигментов бумажки смачивают несколькими каплями этилового эфира.

ГЛАВА X

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПИГМЕНТОВ

Конечной задачей всякого экспериментального исследования пигментов является количественная оценка содержания их в исследуемом материале. Следует помнить при этом, что и вопросы качественного порядка следует решать количественными методами. Поэтому задача количественного определения пигментов приобретает очень большое значение. Задачи, возникающие перед исследователем, определяют характер и способы их решения. Следует различать способы количественного определения пигментов в экстракте без предварительного разделения и определение количества пигментов после их разделения на компоненты. Так, например, в спиртовой или ацетоновой вытяжке, содержащей смесь всех пигментов, можно определить концентрацию хлорофиллов без предварительного отделения их от других пигментов. Это возможно благодаря тому, что хлорофилл поглощает в красной части спектра, в которой отсутствует поглощение у каротиноидов. Обратная задача — определение каротиноидов в смеси с хлорофиллами — весьма затруднительна, так как каротиноиды поглощают в синих лучах, т. е. там, где и у хлорофиллов имеется максимум поглощения.

Количественное определение пигментов основано на использовании их оптических свойств. Различают 3 категории оптических приборов, с помощью которых возможно количественное определение пигментов: колориметры, фотоэлектроколориметры и спектрофотометры.

Колориметр Дюбоска является визуальным прибором. Это означает, что определение на нем зависит от глаза наблюдателя. При помощи колориметра производится визуальная оценка окраски пигмента по сравнению со стандартным раствором известной концентрации. При равенстве окраски концентрации испытуемого и стандартного растворов обратно пропорциональны высоте столба, т. е. толщине слоя. Толщина слоя изменяется погружением прозрачного стеклянного цилиндра в стаканчик с раствором. Преимущество такого колориметра состоит в том,

что он может быть применен в полевых условиях, даже в отсутствие электрического освещения. Недостатком приборов такого типа является известная субъективность, вызываемая необходимостью визуальной оценки равенства оттенков цвета. Другим недостатком колориметра является необходимость пользования стандартным раствором.

Другим визуальным прибором, при работе с которым можно избежать необходимости работать со стандартом, является ступенчатый фотометр Пульфриха. Этот прибор снабжен набором светофильтров и щелевой диафрагмой, связанной с круговой шкалой, по которой производится отсчет показаний.

Фотоэлектроколориметр относится к объективным приборам. В этом приборе свет от электрической лампочки с помощью двух зеркал направляется на два фотоэлемента. На пути световых пучков помещаются 2 кюветы, в одну из которых наливается растворитель, а в другую помещается раствор, т. е. растворитель плюс пигмент. Свет, проходя через кюветы, ослабляется — в первой за счет поглощения стенками кюветы и растворителем, а во второй кювете — еще и растворенным пигментом. Эта разница регистрируется с помощью фотоэлементов, в которых возникают различные ЭДС; разница компенсируется закрытием диафрагмы, степень которого определяется по круговой шкале. Точка компенсации устанавливается по чувствительному гальванометру (нуль-инструмент). Как видно из сказанного, этот прибор имеет большое преимущество перед визуальными, так как уравнивание интенсивностей света производится, с одной стороны, без помощи стандартного раствора и, с другой стороны, не зависит от субъективности глаза экспериментатора. Величина концентрации определяется по специальной калибровочной кривой или по таблице. Для того чтобы сделать фотоэлектроколориметр более чувствительным, поглощение пигментами происходит не из белого света, а из цветного пучка, полученного при помощи специальных светофильтров. Светофильтры подбираются таким образом, чтобы пропускаемый ими свет максимально поглощался соответствующим пигментом. Так, например, хлорофиллы, имеющие поглощение в красном свете, определяются за красным светофильтром, а каротиноиды, поглощающие в синем свете, определяются за синим светофильтром.

Другим типом объективных приборов является спектрофотометр. Основной частью спектрофотометра является монохроматор, позволяющий выделить узкий пучок монохроматического света. Разрешающая способность спектрофотометра (СФ-4) составляет десятые доли миллимикрона. Такой монохроматический пучок света пропускается через кювету с растворителем на чувствительный фотоэлемент. Возникающий при этом ток с помощью усилителя поступает через выходное устройство на гальванометр, отклонение стрелки которого компенсируется с помощью

щелевой диафрагмы. После этого на пути пучка помещается испытуемый раствор. Возникающая при этом на фотоэлементе ЭДС вызывает отклонение стрелки гальванометра: последняя приводится в нулевое положение с помощью особого компенсационного отсчетного устройства. Показание шкалы отсчетного устройства пропорционально концентрации пигмента. Спектрофотометры являются высокочувствительными приборами и незаменимы в тех случаях, когда возникает необходимость установления спектральных кривых. При количественном определении пигментов на спектрофотометре нужно быть уверенным, что работа ведется в максимуме поглощения данного вещества.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПИГМЕНТОВ НА ВИЗУАЛЬНЫХ ОПТИЧЕСКИХ ПРИБОРАХ

Колориметр Дюбоска

В современных хорошо оборудованных лабораториях колориметры типа колориметра Дюбоска имеют лишь вспомогательное значение, но их значение сильно возрастает в условиях экспедиции, или полевых условиях, или, наконец, там, где нет электрического освещения. Поэтому нам кажется целесообразным подробно описать порядок определения пигментов на колориметре Дюбоска.

Основным моментом, определяющим хорошую работу на колориметре Дюбоска, является приготовление стандартного раствора. Наилучшим стандартом может служить раствор исследуемого вещества известной концентрации. Для его приготовления берется навеска определенного вещества — хлорофилла или каротиноида — и растворяется в отмеренном объеме растворителя (см. главу XI).

Стандартный раствор наливают в один из стаканчиков колориметра, а в другой наливают раствор исследуемый. Поворотом винтов поднимают или опускают стаканчики до тех пор, пока станет одинаковой интенсивность окраски двух полукругов, рассматриваемых в окуляр. Очень слабая или очень сильная окраска не позволяют достаточно точно выровнять оттенки обеих половинок, поэтому рекомендуется работать при средних интенсивностях окраски. Такая интенсивность подбирается опытным путем для каждого из пигментов. С помощью шкалы, снабженной нониусом, отсчитывают показания высоты слоя в обоих стаканчиках. Эта операция проделывается 10 раз. Затем вычисляется среднее. Количество пигмента вычисляется по следующей формуле:

$$\frac{\text{Объем раствора пигментов} \times \text{Высота столба стандартного раствора} \times \text{Концентрация стандартного раствора}}{\text{Высота столба испытуемого раствора} \times \text{Навеска}}$$

Если объем раствора дан в мл, концентрация стандартного раствора в мкг/мл, а навеска в г, то полученная концентрация пигментов в исходном материале будет иметь размерность мкг/мл.

Для большей точности работы поступают следующим образом. Налив в оба стаканчика стандартный раствор, устанавливают, при какой толщине слоя получаются наилучшие равенства оттенков. Полученная толщина применяется для стандартного раствора в качестве постоянной, а меняется только толщина испытуемого раствора. Перед определением концентрации нужно уравнять количество света, падающего на оба стаканчика. Это достигается тем, что, налив в стаканчики испытуемый и стандартный растворы, поднимают стаканчики до нулевого положения. При нулевой толщине слоя видны два белых поля зрения, равенство которых необходимо отрегулировать прежде, чем приступать к анализу. Затем опускают стаканчик со стандартным раствором на глубину, при которой достигается оптимальная толщина слоя, найденная вышеуказанным способом, после чего уравнивают окраску обеих половинок поля зрения опусканием и поднятием стаканчика с испытуемым раствором. Уравнивать интенсивности оттенков необходимо двояким путем — от большей интенсивности и от меньшей интенсивности.

Одним из условий, которое необходимо выполнять при работе с колориметром, является абсолютная прозрачность растворов. Нужно следить за тем, чтобы в растворе не было взвешенных частиц. Если почему-либо раствор оказался мутным, то необходимо его перед анализом отфильтровать или отцентрифугировать.

В тех случаях, когда по тем или иным обстоятельствам нет возможности приготовить стандартный раствор из исследуемого вещества, приготовляют стандартный раствор из веществ, обладающих близкой окраской. Для каротиноидов таким веществом является азобензол, а для хлорофиллов — смесь медного купороса и двухромовокислого калия, растворенная в 7%-м аммиаке.

Ступенчатый фотометр (штуффенфотометр Пульфриха)

При работе с фотометром Пульфриха обходятся без помощи постоянного стандартного раствора; стандартный раствор необходим лишь для первоначальной калибровки прибора. Ступенчатый фотометр снабжен набором светофильтров, с помощью которых можно подобрать наиболее подходящую область спектра, в которой придется производить фотометрирование. Наиболее удобным способом это установить можно так. Шкалу на барабане, связанном с диафрагмой против кюветы с растворителем, устанавливают в нулевое положение. Затем определяют показания шкалы второго барабана, связанного с диафрагмой против кюветы с раствором, при последовательной смене светофильтров. В соответствии с тем, за каким из фильтров данный

пигмент покажет наибольшее значение по этой шкале, и выбирают фильтр для работы.

Так, например, устанавливается, за каким из красных светофильтров следует работать с хлорофиллом и за каким из синих светофильтров — с каротиноидами.

При работе с штуффенфотометром следует помнить об одном обстоятельстве. В колориметре Дюбоска цветовое поле образуется из двух половинок, каждая из которых получается в результате поглощения света растворами — стандартным и испытуемым. В ступенчатом фотометре цветовой круг образуется светофильтрами; одна из половинок круга получается за счет растворителя, а другая за счет раствора. Поэтому в большинстве случаев обе половинки несколько отличаются по оттенку. Поэтому при работе на штуффенфотометре приходится уравнивать интенсивности, пренебрегая разницей в оттенке. Как и при работе с колориметром, полезно делать несколько отсчетов, причем и в этом случае необходимо уравнивать интенсивность двояко — от большей интенсивности и от меньшей. Так как на штуффенфотометре работают без стандартного раствора, нужно диафрагму с растворителем при помощи барабанной шкалы установить на нуль, а отсчет делать по показаниям шкалы, соответствующей кювете с раствором. На барабане нанесена двойная шкала — черная и красная. Черная шкала показывает процент пропускания, и деления на ней нанесены равномерно. Красная шкала показывает оптическую плотность, и деления на ней нанесены в логарифмическом масштабе. Обе шкалы связаны между собой следующим равенством:

$$\text{Оптическая плотность} = 2 - \text{логарифм процента пропускания.}$$

Описывая работу с колориметром, мы указывали на то обстоятельство, что необходимо подбирать оптимальную толщину слоя для стандартного раствора. На штуффенфотометре следует работать при оптической плотности в пределе так называемого фотометрического интервала, который лежит между 0.15 и 1.3; с этой целью к фотометру прилагается набор кювет различной толщины. Чем крепче исследуемый раствор, тем тоньше нужно брать кювету, и, наоборот, чем слабее раствор, тем толще кювета.

Для перевода показаний шкалы на барабане в величины концентрации пигмента необходимо для каждого из пигментов построить калибровочную кривую.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПИГМЕНТОВ НА ОБЪЕКТИВНЫХ ПРИБОРАХ

Фотоэлектроколориметр

Существует несколько марок фотоэлектроколориметров. В нашей лаборатории предпочтение отдается прибору марки ФЭК-М. Как и при работе с штуффенфотометром, фотоэлектроколориметр

не требует постоянного применения стандарта, но в отличие от штуффенфотометра определение оптической плотности раствора производится с помощью фотоэлементов и гальванометра. Инструкция по работе с колориметром, прилагаемая к прибору, позволяет подробно разобраться в последовательности операций. Однако мы считаем своим долгом осветить те специфические особенности работы с пигментами, которые позволяют избежать ошибок и помогут преодолеть некоторые затруднения, возникающие при работе.

Юстировка прибора. Источником света в фотоэлектроколориметре ФЭК-М является 8-вольтовая 30-ваттная лампочка. С помощью двух расположенных под углом зеркал образуются два источника света. Каждый из них с помощью системы линз собирается в параллельный пучок света, попадающий на фотоэлемент. В зависимости от положения нити лампочки интенсивность пучка может быть различной. Небольшие различия в интенсивностях пучков могут быть компенсированы с помощью нейтральных клиньев, расположенных на пути левого светового пучка. При очень большой разнице в интенсивностях света нейтральных клиньев недостаточно для выравнивания ЭДС, возникающих на правом и левом фотоэлементах. Поэтому перед началом работы на приборе его необходимо отъюстировать. Юстировка прибора состоит в том, что с помощью специальных винтов, расположенных в цоколе лампочки, регулируют положение лампочки таким образом, чтобы нить лампочки четко спроектировалась на фокусирующих линзах. Изображение нити легко заметить, если приложить к линзе спереди кусочек кальки или папиросной бумаги. Нить должна быть расположена вертикально по середине круглой линзы, по обеим сторонам нити должны оставаться равные по площади секторы круга. Отъюстированный таким образом прибор обеспечит удовлетворительную работу.

Выбор способа определения. Определение концентрации пигмента при помощи фотоэлектроколориметра основано на измерении разности ЭДС, возникающей между двумя фотоэлементами вследствие неравенства интенсивности световых пучков, проходящих через кюветы с растворителем и раствором. Измерение это производится выравниванием интенсивности при помощи диафрагмы, расположенной против правого фотоэлемента и при помощи нейтральных клиньев, расположенных против левого фотоэлемента. Степень открытия щелевой диафрагмы регулируется вращением двух барабанов, насаженных на общую ось. Фотоэлектроколориметр позволяет уравнять интенсивность пучков двумя способами.

С помощью нейтральных клиньев уравнивают интенсивности световых пучков, проходящих через левую и правую кюветы, содержащие чистый растворитель. Затем одну из кювет поворотом рукоятки каретки заменяют кюветой, содержащей раствор ис-

следуемого пигмента. Само собой разумеется, что световой пучок, проходящий через раствор, станет слабее. Поэтому для выравнивания ЭДС нужно увеличить щель диафрагмы.

Другой способ заключается в том, что с помощью нейтральных клиньев выравнивают интенсивности световых пучков, проходящих через кюветы с растворителем и с раствором пигмента. Затем заменяют кювету с раствором на кювету с растворителем. Это приводит к усилению пучка света, проходящего через смененную кювету. Для выравнивания интенсивности пучков, естественно, следует уменьшить ширину щели, что достигается закрытием диафрагмы.

Как открытие, так и закрытие щелевой диафрагмы производится вращением барабана, поэтому сменяемая кювета всегда должна стоять против правого фотоэлемента. Так как по первому способу после смены кюветы происходит ослабление пучка и для выравнивания светового пучка щель должна быть увеличена, исходная ширина щели должна быть минимальной. Это достигается поворотом барабана от себя до упора. Отсчет производится в этом случае по шкале, расположенной на правом барабане. По второму способу после смены кювет происходит усиление светового пучка и для выранивания интенсивностей световых пучков щель должна быть уменьшена, поэтому исходная ширина щели должна быть достаточно большой. Это достигается поворотом барабана до нулевого положения красной шкалы на левом барабане, что соответствует 100% пропускания по черной шкале левого барабана. В этом случае отсчет производится по показанию на левом барабане.

Выбор того или иного способа определяется концентрацией пигмента в растворе. При очень слабых растворах рекомендуется пользоваться первым способом. При работе с пигментами мы обычно пользуемся вторым способом.

Выбор светофильтра. Прибор снабжен четырьмя светофильтрами: зеленым, синим, красным и белым.

При выборе светофильтра следует руководствоваться теми же принципами, которые были описаны для работы со штуффенфотометром. В случае ФЭК-М выбор несколько упрощается, так как число фильтров невелико. Для работы с каротиноидами нужно пользоваться синим светофильтром, а для работы с хлорофиллами следует применять красный светофильтр. Если желательно измерить сумму пигментов, то можно применять белый свет. В фотоэлектроколориметре марки ФЭК-Н-57 имеется большой набор светофильтров и выбор светофильтра производится в соответствии со спектральными характеристиками пигмента и фильтра.

Выбор кюветы. К прибору прилагаются четыре набора кювет с расстоянием между рабочими гранями 1, 3, 5, 10, 20, 30 и 50 мм. Выбор кюветы будет зависеть от концентрации исследуемого

пигмента. При выборе кюветы следует руководствоваться тем, чтобы показания прибора лежали в пределах фотометрического интервала. Для каротиноидов и хлорофиллов этот интервал расположен между 0.10 и 0.35 красной шкалы на левом барабане. Для удобства дальнейших расчетов желательно пользоваться кюветой с расстоянием между рабочими стенками в 1 см.

Если определение производилось с кюветой другого размера, то при расчете необходимо в полученный результат внести поправку в соответствии с размерами кюветы, которая использовалась при составлении калибровочной кривой.

Например, калибровочная кривая составлялась при помощи кюветы в 1 см. Определение производилось в кювете размером 2 см. Полученную концентрацию следует разделить на два. Если же определение производилось в 0.5-сантиметровой кювете, то следует разделить на 0.5, или, что то же самое, умножить на два.

(Если в ходе работы возникает необходимость изменить размеры кюветы, то следует сменить размеры и кюветы с растворителем).

Показания шкалы на барабане следует перевести в величины концентрации при помощи калибровочной кривой, составление которой подробно описано в конце настоящей главы.

Так как при исследовании пигментов приходится производить определения главным образом в органических растворителях, которые легко испаряются, то нужно не забывать закрывать кюветы крышками.

Спектрофотометр СФ-4

Спектрофотометр СФ-4 является высокочувствительным прибором с объективным отсчетом показаний. Порядок работы с прибором подробно описывается в прилагаемой к нему инструкции. Здесь мы опишем те моменты, которые являются более или менее специфичными для работы с пигментами.

Как следует из описанного выше принципа работы спектрофотометра, определение оптической плотности производится в узком интервале длин волн, выделяемом при помощи монохроматора. Определяя оптическую плотность в растворе данного пигмента при разных длинах волн, получают так называемую спектрофотограмму, форма и расположение максимумов которой является одной из важнейших характеристик для идентификации того или иного пигмента. Для количественного определения можно пользоваться как интегральным поглощением в данной области, так и определением производной в точке максимума. Само собой разумеется, что для интегрального определения нужно затратить большое количество времени, и поэтому обычно определяют оптическую плотность в одном из максимумов. Положение макси-

мума меняется в зависимости от растворителя, наличия примесей, как окрашенных, так и бесцветных. Так, например, максимум поглощения хлорофилла в красной области изменяется, если вместо чистого эфира (этилового) взять эфир с примесью спирта; максимум в ацетоне сдвигается, если разбавлять ацетон водой, и т. д. Поэтому необходимо всегда проверять положение максимума перед тем, как определить оптическую плотность. Кюветодержатель в СФ-4 имеет гнезда для четырех кювет. Так как в одну из кювет наливается растворитель, то можно подряд определить три различных раствора.

Как и на фотоэлектроколориметре, концентрация пигментов определяется на спектрофотометре по оптической плотности. Оптическая плотность при данной длине волны находится в зависимости от концентрации пигментов. Эта зависимость выражается следующей формулой:

$$C = \frac{D}{a_{\text{уд.}}\ d},$$

где C — определяемая концентрация, D — оптическая плотность, отсчитанная по красной шкале на отсчетном устройстве при длине волны, соответствующей максимуму поглощения вещества, $a_{\text{уд.}}$ — удельный коэффициент поглощения, d — толщина слоя исследуемого раствора.

Задача определения концентрации пигментов сводится к определению оптической плотности их растворов при длине волны, соответствующей максимуму поглощения. Выбор максимума для каждого пигмента строго индивидуален.

Каротин определяется в петролейноэфирном или гексановом растворе при длине волны 452 ммк, лютеин — в этаноловом растворе при 445 ммк, виолаксантин — в этаноловом растворе при 442 ммк, неоксантин — в этаноловом растворе при 438 ммк, хлорофиллы a и b — в этиловом эфире при длинах волн соответственно 662 и 642 ммк; все эти данные сопоставлены с удельными коэффициентами экстинкции.

Пигмент	Максимум поглощения, ммк	Растворитель	Удельный коэффициент экстинкции
Каротин	452	Петролейный эфир или гексан	260
Лютеин	445	Этанол	258
Виолаксантин	442	Этанол	225
Неоксантин	438	Этанол	227
Хлорофилл a	662	Этиловый эфир	102,80
Хлорофилл b	642	Этиловый эфир	58.8

ПОСТРОЕНИЕ КАЛИБРОВОЧНЫХ ГРАФИКОВ ДЛЯ РАЗЛИЧНЫХ ПИГМЕНТОВ

Общие принципы

Когда определение пигментов производится на приборах, не требующих применения стандартного раствора, например на ступенчатом фотометре, фотоэлектроколориметре и спектрофотометре, вычисление концентрации исследуемого пигмента осуществляется при помощи калибровочных графиков.

На калибровочном графике приводятся в соответствие величина показания прибора с величиной концентрации исследуемого раствора пигмента.

Как было указано выше, действие оптических приборов основано на измерении прошедшего через раствор света. Отношение интенсивностей падающего и прошедшего через раствор света находится в определенной зависимости от трех величин: а) от природы самого вещества, б) от его концентрации и в) от толщины слоя раствора. Для данного вещества при постоянной толщине слоя это отношение зависит только от концентрации вещества. Десятичный логарифм этого отношения получил название оптической плотности и обозначается буквой D — от английского optical density. (В немецкой литературе буквой D обозначается процент пропускания).

Если по оси абсцисс откладывать концентрацию пигмента, а по оси ординат — оптическую плотность по показанию прибора (красная шкала!), калибровочный график получится в виде прямой линии, проходящей через начало координат. (Если по оси ординат откладывать не оптическую плотность, а процент пропускания (черная шкала!), то график получается в виде кривой линии).

Построим такой прямолинейный график.

Для каждого пигмента угол наклона прямолинейного графика имеет определенную величину. Величину эту определяет отношение абсциссы к ординате, т. е. котангенс угла наклона. Поэтому вместо нахождения концентрации по графику можно пользоваться умножением величины показания прибора по красной шкале на постоянный множитель, являющийся котангенсом угла наклона калибровочного графика. При этом следует помнить, что фактический угол наклона может быть различным в зависимости от выбранного масштаба. Поэтому при вычислении множителя необходимо помнить о выбранном масштабе и котангенс угла вычислять путем деления концентрации на показание прибора.

Эта величина не будет зависеть от масштаба, выбранного при построении графика.

Способы построения калибровочных кривых для пигментов

При описании способов построения калибровочных кривых мы будем исходить из двух возможностей, имеющихся в распоряжении исследователя:

1) из возможности с помощью указанных в следующей главе приемов получить препараты чистых пигментов в количествах, могущих быть взвешенными на аналитических весах, т. е. из возможности приготовить растворы пигментов известной концентрации;

2) из возможности с помощью хроматографии на бумаге или колонке получить элюаты чистых пигментов, т. е. из возможности приготовить растворы неизвестной концентрации.

В первом случае приготовляют 10 растворов различной концентрации. Можно при этом взять 10 различных навесок, но можно ограничиться одной навеской и растворы приготовить путем разведения более крепкого исходного раствора.

В этом случае задача сводится к построению графика в прямоугольных координатах, причем по оси абсцисс следует отложить величины концентрации, а по оси ординат — показания данного прибора.

Чтобы построить график, соединяют десять отдельных точек, полученных с помощью растворов известной концентрации. Начало графика должно совпадать с началом координат.

Для определения неизвестной концентрации испытуемого раствора находят показания прибора и по этому показанию на калибровочном графике находят соответствующую концентрацию.

При работе на спектрофотометре для построения калибровочного графика находят значения оптической плотности для каждой концентрации при длине волны, соответствующей максимуму поглощения данного пигмента в определенном растворителе. Построив график по полученным данным, вычисляют удельный коэффициент абсорбции. Этот коэффициент равен тангенсу угла наклона прямой, полученной при калибровке, и обозначается $\alpha_{уд.}$, если концентрация пигмента выражена в г/л (мг/мл); $\alpha_{мол.}$ обозначает молярный коэффициент абсорбции, получаемый умножением $\alpha_{уд.}$ на молекулярный вес соединения. Пользуясь удельным коэффициентом абсорбции, можно обходиться без калибровочного графика. Для определения концентрации веществ, удельный коэффициент абсорбции которых известен, нужно величину оптической плотности поделить на этот коэффициент; вместо того чтобы делить на коэффициент абсорбции, можно умножать на величину, обратную ему, т. е. на котангенс угла наклона кривой.

Значения удельных коэффициентов абсорбции для ряда пигментов в различных растворителях даны в приложении.

Калибровочный график при работе с фотоэлектроколориметром строится таким же образом. Разница состоит лишь в том, что значения оптической плотности при этом получаются не для данной длины волны, а для интегрального поглощения в данной области спектра, зависящей от характеристики светофильтра.

Сказанное целиком относится и к ступенчатому фотометру.

В том случае, когда нет возможности применить навески чистых веществ, можно воспользоваться растворами чистых пигментов, элюированных с хроматограммы. Для работы на спектрофотометре можно пользоваться известными коэффициентами абсорбции. Чтобы прокалибровать фотоэлектроколориметр при помощи раствора чистых пигментов, существуют два способа в зависимости от того, имеется ли в распоряжении исследователя спектрофотометр или нет.

При наличии спектрофотометра задача упрощается благодаря тому, что известны удельные коэффициенты абсорбции. В этом случае приготовляют десять растворов разной концентрации, снимая пигменты с хроматограмм, на которые были нанесены различные количества исходного раствора. Затем определяют оптические плотности каждого из растворов и путем деления их значений на удельный коэффициент абсорбции устанавливают их концентрации. Затем определяют значения оптической плотности за соответствующим светофильтром фотоэлектроколориметра и строят калибровочный график. По графику вычисляют котангенс угла и используют его для определения концентрации по оптической плотности.

Задача несколько осложняется в том случае, когда в лаборатории нет спектрофотометра, а в распоряжении исследователя имеются только растворы пигментов. Фотоэлектроколориметр калибруют при помощи колориметра Дюбоска. Растворы чистых пигментов готовят путем элюирования их с хроматограмм и устанавливают их концентрацию по стандартным растворам. В качестве стандартных используют растворы веществ, имеющих близкую по цвету окраску. Для каротиноидов ближе всего азобензол, а для хлорофилла — растворы медного купороса в аммиаке.

ГЛАВА XI

ПРЕПАРАТИВНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ПИГМЕНТОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

ХЛОРОФИЛЛЫ И ИХ ПРОИЗВОДНЫЕ

Получение растворов хлорофиллов

Сырьем для получения хлорофилла $a+b$ являются листья крапивы (*Urtica dioica* L.). Выбор именно этого растения объясняется тем, что в его листьях активность фермента хлорофиллазы в условиях препаративного получения весьма низка. Это позволяет получить неизмененный хлорофилл, содержащий фитольную часть. Листья крапивы могут быть использованы как в свежем, так и в высушенном виде.

Получение растворов хлорофиллов $a+b$ из свежих листьев

Сбор листьев. Сбор листьев лучше всего производить в июне—июле. Для получения большего выхода хлорофилла следует выбирать растения из затененных мест произрастания, листья — здоровые и неповрежденные. Собирать листья нужно в темный бумажный или матерчатый мешок. Собранные листья следует пускать в обработку в тот же день.

Измельчение листьев. Перед измельчением листья необходимо отмыть от пыли и грязи, после чего протереть слегка марлей или фильтровальной бумагой и освободиться от средней жилки. Измельчение производится либо в ступке с кварцевым песком, либо в гомогенизаторе. При измельчении следует соблюдать все меры предосторожности, указанные в главе VIII.

Экстракция. Для удаления бесцветных, растворимых в воде и спирте веществ производят предварительную обработку листьев 50—60%-м ацетоном. Для нейтрализации клеточного сока ацетон слегка подщелачивается небольшим количеством двууглекислого натрия из расчета 5 г/л: 10 г двууглекислого натрия

растворяются в 1 л воды, который служит для приготовления 2 л водного раствора ацетона.

Предварительная экстракция повторяется пять раз; водного ацетона для каждой экстракции берется двойное количество по сравнению с весом листьев. Первые две порции имеют грязно-бурый цвет и не содержат зеленых пигментов. Следующие две порции имеют желтый и желтовато-зеленый цвет, свидетельствующий о начале извлечения ксантофиллов и следов хлорофиллов, а последняя порция имеет слегка зеленый цвет благодаря частичному извлечению хлорофиллов. Несмотря на то что при такого рода предварительной экстракции и происходит частичная потеря хлорофиллов, она тем не менее является целесообразной, так как значительно облегчает последующую очистку их от ксантофиллов.

После того как с помощью предварительной экстракции частично удалены ксантофиллы, приступают к экстракции чистым ацетоном. Для этого мязгу заливают на воронке Бюхнера, смонтированной на отсосной колбе, чистым ацетоном и оставляют на некоторое время настаиваться.

Создав при помощи водоструйного или масляного насоса небольшое разрежение в колбе Бунзена, отсасывают в нее экстракт, в котором содержатся часть ксантофиллов, каротин и хлорофиллы $a+b$.

Оставшаяся на фильтре мязга промывается еще два-три раза ацетоном. При этом для препаративных целей не следует добиваться полноты извлечения пигментов, как это следует делать при количественном определении; некоторая потеря хлорофиллов менее существенна, чем излишнее разбавление экстракта.

Перевод пигментов в петролейный эфир. Перевод пигментов из раствора их в чистом ацетоне производится в два этапа. Прибавлением в делительной воронке к ацетоновому раствору равного объема петролейного эфира получают раствор пигментов в смеси двух растворителей; после этого медленным прибавлением воды вызывают расслоение на две фазы: нижняя фаза состоит из водного ацетона, а верхняя — из раствора пигментов в петролейном эфире. Большим количеством воды отмывают петролейноэфирный раствор пигментов от ацетона.

Отмывка ксантофиллов. Дальнейшим этапом препаративного получения хлорофиллов $a+b$ является удаление из петролейного эфира растворенных в нем ксантофиллов. С этой целью в делительной воронке петролейноэфирный раствор пигментов встряхивается с 80%-м метиловым спиртом. Следует заметить, что вместе с ксантофиллами в метанол переходит небольшое количество хлорофиллов, главным образом хлорофилла b. По прекращении встряхивания происходит быстрое расслоение обоих растворителей, гипофазный метанол сливают, и процедуру повторяют с новой порцией метилового спирта. Отмывание ксанто-

филлов прекращают лишь после того, как будут удалены окончательно их следы. За ходом извлечения ксантофиллов необходимо вести постоянное наблюдение при помощи контрольных хроматограмм на бумаге.

Контрольная хроматограмма делается таким образом. На уголок бумажного прямоугольника наносится в виде небольшой полоски стартовое пятно из вытяжки. Бумажку с нанесенным пятном помещают в банку, на дно которой налит растворитель (смесь бензола с петролейным эфиром). Уже через несколько минут можно убедиться в наличии или отсутствии ксантофиллов.

Осаждение хлорофиллов. Эта операция основана на нерастворимости хлорофиллов в чистом петролейном эфире. До тех пор пока в петролейном эфире присутствуют следы полярных веществ, хлорофиллы еще удерживаются в растворе. Но после удаления полярных веществ, растворимых в петролейном эфире, хлорофиллы выпадают из раствора. Отмывая метанолом ксантофиллы, можно осуществить удаление и бесцветных полярных веществ. Остается отмыть метанол. Это достигается встряхиванием петролейного эфира с водой, вода растворяет метанол; водный раствор метанола отделяется в делительной воронке. Следует обратить внимание на одно очень важное обстоятельство: когда основная часть метанола удалена, встряхивание с водой петролейного эфира вызывает образование очень стойких эмульсий, что затрудняет последующее расслоение. Поэтому рекомендуется последние порции метанола удалять без встряхивания; для этого промывание в делительной воронке ведется таким образом, чтобы небольшая струйка воды стекала по стенке воронки, промывая петролейный эфир. Избыток воды время от времени сливают, открывая кран. После удаления следов метанола, т. е. когда в петролейном эфире не остается полярных веществ, петролейноэфирный раствор мутится, исчезает его флуоресценция и хлорофилл выпадает в виде мелко диспергированного осадка.

Отделение от каротина. Так как каротин имеет строение углеводорода, он при всех этих операциях остается растворенным в петролейном эфире. Это позволяет отделить хлорофилл от каротина путем фильтрования его раствора через слой талька. Ход операций при этом таков.

Прибавлением к петролейному эфиру некоторого количества талька и безводного сернокислого натрия вызывают коагуляцию мелко диспергированного осадка хлорофилла и частичное осаждение этих коагулированных частиц на тальке, а также удаление следов воды из петролейного эфира. Дальнейшее отделение хлорофилла производится на стеклянном фильтре или на небольшой воронке Бюхнера. Осадок хлорофилла, задерживаясь на тальке, образует на нем черную зону, а каротин в растворе проходит в фильтрат вместе с растворителем. Хлорофилл на

тальке промывают многократно сначала высоко кипящими фракциями петролейного эфира (60—80°), потом низко кипящими фракциями (35—50°). Промыванием достигается удаление следов каротина и бесцветных липидов из хлорофилла, а затем и высоко кипящих фракций петролейного эфира.

За отмывкой каротина рекомендуется следить при помощи контрольной хроматограммы в петролейном эфире.

Нужно помнить, что на этом этапе работы мы имеем дело с чистым хлорофиллом, который особенно чувствителен, легко претерпевает различного рода превращения, в частности, легко феофитинизируется. Поэтому необходимо особенно тщательно придерживаться тех мер предосторожности, которые приняты во время работы с пигментами вообще. Так, например, нужно работать быстро, в затемненной комнате при слабом свете, нельзя оставлять хлорофилл на слое талька без покрытия его слоем растворителя. Надо также следить за тем, чтобы поблизости не было паров кислот: соляной, уксусной, азотной и т. п.

Получение раствора чистого хлорофилла *a*+*b*. После того как хлорофилл очищен от других пигментов и бесцветных спутников, его можно «снять» с талька, растворив его в этиловом эфире. Для этого в воронку наливают небольшое количество этилового эфира и при разрежении фильтруют эфир через тальк. Этиловый эфир с легкостью растворяет хлорофиллы, и тальк становится бесцветным. Полученный раствор несколько раз промывается в делительной воронке водой, сушится безводным сернокислым натрием и запаивается в стеклянную пробирку.

О чистоте полученного пигмента судят по контрольной хроматограмме. По этой методике получить хлорофилл, совершенно свободный от следов феофитина, очень трудно и удается не всегда. Полная очистка от феофитина лучше всего осуществляется при помощи хроматографии.

Получение растворов хлорофиллов *a*+*b* из сухих листьев

Преимуществом получения хлорофилла из сухих листьев является возможность работы с материалом в зимнее время.

Заготовка материала. Исходным сырьем являются листья крапивы. Листья крапивы можно купить в аптеке, но лучше пользоваться собственным сбором. Сбор следует производить в летние месяцы. Листья очищают от пыли и высушивают в сухом темном помещении при комнатной температуре (18—22°). Хорошо высушенные листья измельчаются на мельнице.

Заготовленный таким образом порошок в сухом темном месте может храниться в течение многих месяцев.

Экстракция пигментов. Отличительным моментом методики получения хлорофиллов из сухих листьев по сравнению с полу-

чением их из свежих является именно способ экстракции. Так как при сушке происходит концентрация всех водорастворимых веществ, содержавшихся в вакуолях клеток, то для лучшего извлечения пигментов следует произвести 4—5-кратное предварительное промывание водой, а потом и 50%-м ацетоном. Извлечение пигментов производится при помощи ацетона.

Полученный экстракт далее обрабатывается, как это было указано выше. В этом случае нет нужды в специальном добавлении воды.

Раствор хлорофиллов *a*+*b* может служить для решения целого ряда задач: для получения 1) хлорофиллов *a*+*b* в кристаллическом состоянии; 2) чистых хлорофиллов *a* и *b* при помощи хроматографии; 3) стандартного раствора при количественном определении хлорофиллов; 4) чистых производных хлорофилла; 5) аморфного сухого хлорофилла *a*+*b*; 6) искусственных комплексов, а также для использования в качестве метчиков при хроматографии.

Получение хлорофилла *a*+*b*, свободного от растворителя

При исследовании пигментов может возникнуть необходимость иметь хлорофилл е в растворе, а в свободном от растворителя состоянии. При этом различают состояния аморфное и кристаллическое. Так как для получения хлорофилла в том или ином состоянии требуется соблюдение разных условий, то мы опишем отдельно получение хлорофилла в аморфном и кристаллическом состоянии.

Получение хлорофилла *a*+*b* в аморфном состоянии

Задача сводится практически к операции удаления растворителя. Эта задача решается довольно просто, если получаемый хлорофилл должен быть использован непосредственно вслед за удалением растворителя, например для получения искусственных комплексов или производных хлорофилла.

Если между моментом получения хлорофилла и использованием лежит значительный промежуток времени, задача несколько усложняется. Поэтому мы опишем операции раздельно.

Получение хлорофилла *a*+*b* для непосредственного использования. Раствор хлорофилла в этиловом эфире получается довольно разбавленным — примерно в концентрации, равной 0.1%, т. е. 1 г хлорофилла на 1000 мл раствора.

Сконцентрировать раствор стойкого органического соединения в этиловом эфире — дело весьма нетрудное, так как этот

растворитель кипит при 35°. Однако, имея дело с таким весьма нестойким веществом, каким является хлорофилл, приходится соблюдать целый ряд мер предосторожности. Так как магний вытесняется даже такой слабой кислотой, как H_2CO_3, то концентрирование раствора следует вести в отсутствие воздуха. Это достигается отгонкой эфира под вакуумом. Сгущение производится до тех пор, пока раствор не приобретет большой вязкости, близкой к вязкости сиропа.

Для окончательного удаления растворителя сгущенный раствор переносят в фарфоровую или платиновую чашечку, которую помещают в вакуум-эксикатор. В эксикатор заранее загружается хлористый кальций для поглощения следов влаги. Масляным насосом создается вакуум, и эксикатор ставится в полную темноту, по возможности в холодильник, на 48 час. За это время необходимо 2—3 раза произвести дополнительную откачку масляным насосом.

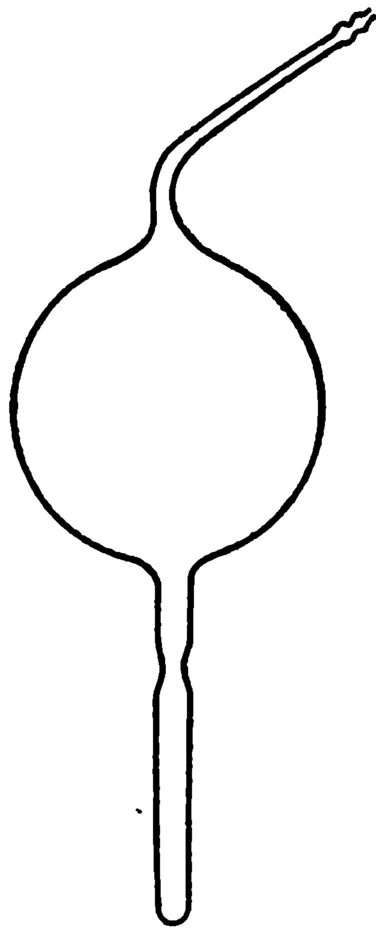


Рис. 38. Колба для сгущения растворов.

На стенке чашечки образуются сухие пленки хлорофилла; эти пленки соскабливают стеклянной палочкой и употребляют для дальнейшей работы.

Получение хлорофиллов $a+b$ **с целью длительного хранения.** Приготовленный указанным выше способом аморфный хлорофилл не пригоден для долгого хранения. Для получения хлорофилла, способного долго сохраняться, необходимо обе операции — сгущение раствора и окончательное удаление растворителя — вести без нарушения вакуума. Это достигается следующим образом.

Исходный разбавленный раствор хлорофилла в этиловом эфире наливается в шаровую колбу из молибденового стекла. Внизу к колбе припаяна пробирка, перетянутая посредине (рис. 38). Раствором заполняют полностью пробирку и примерно около трети колбы. Колбу присоединяют к приемнику, охлаждающемуся льдом, а приемник в свою очередь — к вакуумному насосу. Создав вакуум, отключают насос, и растворитель благодаря существующему перепаду температур собирается в приемнике. Обращаем внимание на то, что во избежание перебрасывания раствора следует создавать вакуум постепенно. Это достигается с помощью стеклянной трубки, снабженной двумя кранами — один кран расположен ближе к насосу, а другой — ближе к приемнику. При открытом первом кране и закрытом втором кране создают вакуум в системе, после чего перекрывают первый и открывают второй кран. Многократным повторением этой процедуры добиваются вакуума в колбе и приемнике. По

мере удаления растворителя в приемнике раствор сгущается и собирается в нижнюю пробирку; когда весь растворитель удален, на дне пробирки остается сухой остаток. Не нарушая вакуума, с помощью переносной газовой горелки запаивают нижнюю пробирку по месту перетяжки. В таком виде хлорофилл может в темноте храниться весьма длительное время без значительных разрушений.

Получение хлорофиллов *a+b* в кристаллическом состоянии

Долгое время считалось, что благодаря наличию в молекуле хлорофилла фитольного «хвоста» он вообще не может быть получен в кристаллическом состоянии. И в самом деле, как показывал рентгеноструктурный анализ, все препараты хлорофилла обнаруживали лишь аморфную структуру. Лишь в последние годы благодаря изменению методики окончательного удаления растворителя был получен хлорофилл в кристаллическом состоянии. В этом состоянии он обнаруживает четкую кристаллическую решетку при рентгеноструктурном анализе.

В более ранних методиках особое внимание обращалось на то, чтобы концентрирование раствора и окончательное удаление растворителя производилось при постоянной сушке раствора. Между тем, как оказалось, для получения хлорофилла в кристаллическом состоянии необходимо было вести эти операции в присутствии небольшого количества влаги.

Ниже описана методика получения хлорофилла в кристаллическом состоянии в том виде, как она применяется в нашей лаборатории.

К отмеренному объему сконцентрированного исходного раствора хлорофилла в этиловом эфире прибавляется 2—3 объема петролейного эфира. Полученный раствор хлорофилла в смеси растворителей переносится в фарфоровую чашку. Следует здесь отметить, что для получения хлорофилла в кристаллическом состоянии не следует сушить исходный раствор хлорофилла в этиловом эфире.

Если же исходным материалом для получения хлорофилла в кристаллическом состоянии служит сухой аморфный хлорофилл, то после растворения его в этиловом эфире необходимо раствор увлажнить, для чего в делительной воронке встряхивают его с водой.

Можно добиться хорошей кристаллизации, если испарение растворителей вести медленно, что достигается помещением чашки с раствором на холод (в темный холодильник). На поверхности воды образуются черные пленки, представляющие собой хлорофилл в кристаллическом состоянии.

После испарения воды сухие пленки собирают в пробирку, которую запаивают и хранят в темноте.

Следует указать, что по этой методике получить пленки кристаллического хлорофилла не всегда удается. Чтобы быть уверенным в том, что пленки состоят действительно из хлорофилла в кристаллическом состоянии, необходимо вести спектроскопический или рентгеноструктурный контроль.

Одним из необходимейших факторов для удачного получения хлорофилла в кристаллическом состоянии является работа с очень концентрированными растворами аморфного хлорофилла. В отличие от аморфного хлорофилла тускло-черного цвета хлорофилл в кристаллическом состоянии имеет характерный металлический блеск.

Разделение хлорофиллов $a+b$

При проведении опытов с пигментами бывает необходимо экспериментировать не только со смесью двух компонент, но и с индивидуальными соединениями. Поэтому очень важным оказывается уметь разделять хлорофиллы a и b. Методика разделения хлорофиллов a и b для количественного определения будет описана в следующей главе. Здесь пойдет речь о разделении хлорофиллов с целью препаративного их получения.

Для разделения хлорофиллов a и b мы пользуемся хроматографическим методом, используя как колонку, так и бумагу.

Исходным материалом для хроматографии является либо раствор хлорофиллов $a+b$ в этиловом эфире, полученный вышеуказанным способом, либо сухой препарат хлорофилла $a+b$.

Так как в чистом петролейном эфире хлорофиллы не растворяются, а из чистого этилового эфира не адсорбируются, то первая операция заключается в том, чтобы получить раствор хлорофиллов $a+b$ в петролейном эфире, содержащем небольшое количество полярного растворителя. Этого достигают двумя способами.

Первый способ применяется в том случае, если исходным материалом служит раствор хлорофилла в этиловом эфире. В этом случае один объем раствора в этиловом эфире разбавляют десятью объемами петролейного эфира, после чего дают растворителям несколько испариться.

Второй способ следует применять при работе с сухим препаратом хлорофилла. К сухому препарату прибавляют несколько капель этилового эфира и затем растворяют в 0.5%-м растворе пропанола в петролейном эфире.

Если раствор оказывается мутным, его следует или отцентрифугировать, или отфильтровать. Приготовленный таким образом раствор наносится на колонку из мелко растертой сахарозы, смешанной с картофельным крахмалом в отношении 3 1. Осо-

бое внимание следует обратить на набивку колонки. Смесь сахарозы с крахмалом взмучивается в стакане с петролейным эфиром до консистенции жидкой кашицы. Этой кашицей через воронку и заполняется колонка. Колонкой может служить длинная цилиндрическая трубка диаметром 1.5—2 см и длиной 20—50 см, с оттянутым внизу сужением. Для того чтобы адсорбент не высыпался, в колонку около суженной части помещают бусинку, на которую кладется ватный тампон.

Фильтрование раствора производится при отсасывании из колбы Бунзена, на которую монтируется стеклянная трубка. Хлорофилл *a* располагается ниже хлорофилла *b*. После того как вся порция раствора пропитает верхний слой адсорбента, дальнейшее проявление производится чистым растворителем (0.5%-й пропанол в петролейном эфире).

Благодаря более быстрому продвижению хлорофилла *a* его удается собрать в приемник. Хлорофилл *b* — сильнее адсорбируемый компонент — остается на колонке и снимается с адсорбента серным эфиром.

Хлорофилл *a* получается достаточно чистым, без примеси хлорофилла *b* уже после первого хроматографирования. Для получения же чистого хлорофилла *b* требуется повторное его хроматографирование.

Получение метилхлорофиллидов $a+b$

Сырьем для получения метилхлорофиллида являются листья борщевика. Это растение обладает высокоактивной хлорофиллазой и поэтому наиболее подходит для получения метилхлорофиллида. Собирать листья нужно в летние месяцы. При сборе следует соблюдать меры предосторожности, так как тургесцентные листья борщевика при прикосновении к обнаженным частям тела могут вызвать ожоги. Поэтому настоятельно рекомендуем собирать листья и раскладывать их для сушки в резиновых перчатках. Высушенные листья размалываются на мельнице.

Для успешного получения метилхлорофиллидов очень важно правильно подобрать соотношение растворителей. Это соотношение должно удовлетворять трем условиям. Во-первых, смесь растворителей должна хорошо экстрагировать хлорофилл; во-вторых, она должна быть оптимальной для действия хлорофиллазы, и, в-третьих, она должна быть такой, чтобы метанолиз преобладал над гидролизом. Первое условие удовлетворяется наличием в смеси ацетона, второе — воды, а третье — метанола.

Для воздушно-сухих листьев наилучшим соотношением растворителей (в объемных процентах) является: ацетона 78, метанола 15, воды 7.

Навеска муки из листьев борщевика (около 200 г) перемешивается тщательно с 400 мл смеси ацетона, метилового спирта и воды в указанных соотношениях. Получившуюся массу остав-

ляют стоять в течение 40 час. В этих условиях происходит переэстерификация и фитол в молекуле хлорофилла замещается метиловым спиртом.

Об окончании реакции метанолиза судят по так называемой солянокислой пробе. Для осуществления этой пробы небольшую порцию вытяжки переводят в этиловый эфир и в делительной воронке встряхивают с 22%-й соляной кислотой. Если гипофаза окрашивается в синий цвет, это свидетельствует о прошедшей реакции; при этом эпифаза должна становиться слегка зеленой.

После того как реакция метанолиза закончилась, массу переносят на воронку Бюхнера и настаивают с 400—500 мл ацетона в течение получаса. При небольшом разрежении вытяжка медленно отсасывается. Полученный фильтрат содержит главным образом метилхлорофиллид с примесью хлорофилла и желтых пигментов.

Следующая операция состоит в осаждении пигментов на тальке. К сильно окрашенному раствору пигментов прибавляется 30 г крупно размолотого талька; смесь сильно встряхивается, и к ней добавляется вода. Объем воды не должен быть меньше объема фильтрата. В ходе этой операции происходит кристаллизация метилхлорофиллидов. Кристаллы осаждаются на стенках сосуда на стеклянной палочке, а главным образом на тальке.

Раствор над осадком заметно просветляется. Полное осаждение пигментов достигается за 60 мин.

Полученный осадок фильтруют через слой талька.

Очистка метилхлорофиллидов от других пигментов достигается путем промывания осадка сначала 50%-м ацетоном, а затем 50%-м этанолом. После отсасывания последнего растворителя осадок промывают петролейным эфиром следующим образом. Тальк с осажденным на нем хлорофиллидом переносится в небольшую колбочку, куда затем добавляются легко кипящие фракции петролейного эфира (200 мл). Дальнейшая очистка производится промыванием на фильтре большими количествами петролейного эфира. Окончательная очистка производится промыванием на фильтре смесью петролейного и этилового эфиров (1 1). О чистоте препарата судят по контрольным хроматограммам на бумаге.

Очищенный на тальке метилхорофиллид экстрагируется абсолютным спиртом, к которому для предотвращения алломеризации прибавляют щавелевую кислоту в количестве 0.2 г на 1 л, либо смесью ацетона с этиловым эфиром. В первом случае метилхлорофиллид переводится в этиловый эфир, а во втором случае раствор отмывается водой от ацетона.

Эфирный раствор сушат безводным сернокислым натрием, концентрируют и в вакуум-эксикаторе оставляют для кристаллизации. Выкристаллизовавшийся метилхлорофиллид собирают в пробирку, которую запаивают.

Получение чистого хлорофиллида *a*

Как и чистый хлорофилл *a*, хлорофиллид *a* получают методом хроматографии. Небольшие количества, порядка 100—200 мкг, можно получать на бумаге с помощью особых стеклянных спиральных стоек. Для получения в препаративных целях следует пользоваться колонкой.

Набивка колонки производится так же, как при получении чистых хлорофиллов.

Следует обратить особое внимание на приготовление раствора хлорофиллидов. Хлорофиллид $a+b$ практически нерастворим в смеси пропанола с петролейным эфиром, которая служит для разделения хлорофиллов. Были испытаны различные способы приготовления раствора, пригодного для хроматографирования метилхлорофиллидов, наилучшим оказался следующий.

Сухой порошок метилхлорофиллида растворяется в нескольких каплях ацетона. К этому раствору прибавляется смесь пропанола с петролейным эфиром (5 1000). Если прибавить петролейный эфир без пропанола, происходит осаждение хлорофиллидов из его раствора в ацетоне.

После нанесения этого раствора на колонку производят проявление исходного слоя при помощи чистого петролейного эфира. Это делается для уменьшения концентрации ацетона в смеси растворителей. Чрезмерное промывание чистым эфиром приводит в дальнейшем к образованию очень размытых зон, что весьма нежелательно.

Последующее проявление производится смесью пропанола с петролейным эфиром в указанном соотношении.

Пигменты на колонке располагаются в следующем порядке (в направлении снизу вверх): следы феофитина у самого основания колонки, над ним, иногда слегка перекрывая его, — метилхлорофиллид *a*, еще выше, с интервалом 3—4 см, — метилхлорофиллид *b* и на самом верху, в виде узкой полоски — свободный хлорофиллид.

Метилхлорофиллид *a* смывается в приемник. Полученный раствор служит для получения сухого препарата.

Получение чистого феофитина $a+b$

Как и хлорофилл, феофитин следует получать из листьев крапивы. Удобнее при этом пользоваться сухими листьями. Листья размалываются на мельнице и экстрагируются на воронке Бюхнера 90%-м этанолом (двукратным количеством по весу).

Чтобы получить более высокую концентрацию пигментов, можно рекомендовать так называемую двойную экстракцию:

получают указанным выше способом экстракт из одной порции листовой муки (200 г) и этим экстрактом производят извлечение из другой порции муки.

Для превращения хлорофилла в феофитин к экстракту в конической колбе добавляется 10%-я спиртовая соляная кислота из расчета 2—4 мл на экстракт из 100 г муки. Зеленый раствор превращается в бурый, и начинается постепенное осаждение феофитина. Выпадение идет довольно быстро, и уже через 2 часа можно приступать к следующей операции, но если это необходимо, то на этом этапе можно прервать работу, оставив раствор на ночь в холодном и темном месте. Можно для большей полноты осаждения добавить, после того как закончится реакция феофитинизации, по каплям небольшое количество воды: 1 мл воды на 80 мл спиртового экстракта.

Следующая операция состоит в тщательной очистке от других веществ — непрореагировавшего хлорофилла, каротина, ксантофиллов, а также от бесцветных соединений. Для этого осадок переносят на воронку Бюхнера и многократно промывают сначала 90%-м, а затем 96%-м спиртом. Промывание заканчивают только тогда, когда спирт, проходящий через осадок феофитина, становится совершенно бесцветным.

Так как прибавляемая кислота, кроме вытеснения магния, может вызвать и отщепление фитола с образованием феофорбидов, необходимо осуществлять постоянный контроль с помощью хроматографии на бумаге, с одной стороны, за степенью отмывки, а с другой стороны, и за ходом реакции.

Влажный препарат феофитина снимают с фильтра стеклянной палочкой и измельчают. В сухом виде он измельчается с трудом. Высушивание производят в вакуум-эксикаторе. Из 200 г муки можно получить 700 мг сухого феофитина. Хранить сухой феофитин следует в темном месте в запаянной ампуле.

В ходе работы по получению феофитина может случиться, что препарат будет пересушен на фильтре. В этих случаях его трудно отделить от фильтра. Чтобы избежать потери пигмента, растворяют феофитин в нескольких миллилитрах этилового эфира, из полученного раствора испаряют эфир в чашечке с небольшим количеством воды. Феофитин, остающийся в виде черной пленки на поверхности воды, отделяют от нее и высушивают в вакуум-эксикаторе.

Хроматографическое разделение феофитинов *a* и *b*

Разделение с целью получения значительных количеств препарата следует производить на колонке. В качестве адсорбента берут смесь сахарозы и крахмала в отношении 3 1.

Перед нанесением пигментов колонку промывают 0.5—0.6%-м раствором пропанола в петролейном эфире. Сухой препарат

феофитина $a+b$ смачивают несколькими каплями этилового эфира и растворяют в 0.5%-м растворе пропанола в петролейном эфире. Полученный раствор наносят через ватный тампон на верхнюю часть колонки.

Раствору дают медленно проникнуть в колонку (без отсасывания).

После того как весь раствор проникнет в верхнюю часть колонки, сверху наливают тот же растворитель; пигменты начинают разделяться. Фильтрация растворителя производится при разрежении. Нужно внимательно следить за тем, чтобы над адсорбентом всегда оставался хотя бы небольшой слой растворителя.

При таком способе хроматографирования первым книзу движется феофитин *a* черно-синего цвета. На расстоянии нескольких сантиметров над ним движется феофитин *b* темно-коричневого цвета. Наверху колонки может оставаться кольцо феофорбидов, имеющих коричневато-зеленоватый цвет.

При работе с колонками нужно иметь в виду, что адсорбенты имеют определенную емкость. Поэтому не рекомендуется брать пигменты в количествах, превышающих емкость адсорбента.

Разделенные пигменты собираются в приемник, сгущаются под вакуумом. Окончательное удаление растворителя производится так, как указано выше.

Получение металлопроизводных феофитина

Препаративное получение чистых металлопроизводных феофитина основано на способности двух его водородов замещаться в определенных условиях реакции на соответствующий металл.

В нашей лаборатории освоено получение комплексов феофитина с двухвалентной медью, цинком, кобальтом и трехвалентным железом.

Для получения первых трех производных применяется один и тот же прием, поэтому мы объединяем описание их получения.

Получение медных, цинковых и кобальтовых производных феофитина

Уксуснокислая соль соответствующего металла растворяют при нагревании в уксусной кислоте. Феофитин также растворяют в уксусной кислоте. Оба раствора сливают вместе и нагревают до 60—70° в течение 10—15 мин. Окраска очень быстро изменяется, и раствор приобретает ярко-зеленый оттенок. По окончании реакции, о котором судят по контрольной хроматограмме (отсутствие феофитина), раствор охлаждают до комнатной температуры и прибавляют к нему равный объем этилового эфира.

Полученную смесь переносят в делительную воронку и водой вымывают уксусную кислоту и избыток соли. Пигмент остается в эпифазном эфире. Об окончании промывания судят по нейтральной реакции промывных вод.

Удаление растворителя и получение пигментов в виде твердых пленок или осадка производится так же, как это было указано выше.

Получение железопроизводного феофитина

Чистые железные опилки тщательно промывают ацетоном, спиртом и петролейным эфиром от примесей органических веществ. После удаления последнего растворителя к опилкам прибавляют ледяную уксусную кислоту и нагревают до кипения. Полученный красно-бурый раствор уксуснокислого железа вливают в чашечку с уксуснокислым раствором феофитина. Смесь нагревают до кипения и реакцию ведут в течение 10—15 мин. при температуре 90°. Раствор постепенно приобретает темно-зеленую окраску. Об окончании реакции судят по отсутствию в контрольной порции феофитина. Для этого 1 мл реакционной смеси добавляется к равному объему хлороформа и водой вымывается уксусная кислота и избыток соли. Остающийся в хлороформе пигмент анализируется на контрольной хроматограмме.

Убедившись в том, что реакция замещения водорода железом закончилась, приступают к отделению производного от реакционной смеси. Уксуснокислый раствор сливают в большую пробирку диаметром 3 см. Туда же наливают равный объем хлороформа. При встряхивании образуется общая фаза. Добавлением воды вызывают расслоение на две фазы, причем пигмент остается в гипофазном хлороформе. Большим количеством воды промывают раствор пигмента в хлороформе от избытка солей и уксусной кислоты. Особое внимание следует обратить на отсутствие кислой реакции в промывных водах.

Если реакция прошла полностью и пигмент хорошо отмыт от солей железа, то полученный продукт обладает темно-зеленой окраской с синеватым оттенком.

Реакцию следует проводить в хорошо затемненном помещении: Раствор в хлороформе нельзя хранить сколько-нибудь длительное время, а следует немедленно удалить растворитель, испарив его в темноте. Растворы железопроизводного феофитина весьма нестойки в разных растворителях, и только в этаноле его можно недолго хранить.

Следует обратить внимание на то, что лучше осуществлять реакции получения металлопроизводных не из суммы феофитинов $a+b$, а из отдельных его компонентов. Особенно это относится к получению железопроизводного.

Получение каротина

Сырьем для получения каротина могут служить корнеплоды моркови или листья крапивы.

Получение каротина из корнеплодов моркови

Тщательно вымытые и хорошо очищенные корнеплоды моркови измельчают на крупной терке и высушивают в термостате при температуре 35—40°. Высушенную морковь измельчают на мельнице, просеивают через шелковое сито. Полученную муку из моркови заливают в банке с притертой крышкой петролейным эфиром таким образом, чтобы над мукой находился слой растворителя в 1.5—2 см. Дают муке настояться в течение 2—3 час., после чего раствор сливают; экстракцию повторяют 3—4 раза, последующие порции петролейного эфира настаиваются по 30 мин. Полученные экстракты собирают и отфильтровывают от частиц муки через стеклянный фильтр № 4.

Собранный фильтрат омыляется в делительной воронке 30%-й щелочью в метаноле при постоянном встряхивании в течение 20 мин. Затем раствор каротина в петролейном эфире многократно отмывают водой от метанола и следов щелочи. Об удалении следов щелочи судят по индикатору. Раствор затем высушивают безводным сернокислым натрием. О чистоте каротина на этом этапе судят по контрольной хроматограмме в бензоле с петролейным эфиром.

Следующая операция состоит в осаждении каротина на алюмогеле. Этим способом достигается концентрирование пигмента, отделение его от растворителя и дополнительная очистка от примесей. Алюмогель с осажденным на нем каротином имеет ярко-красную окраску. Каротин снимают с алюмогеля на стеклянном фильтре при помощи небольшой порции этилового эфира.

Полученный раствор сгущают под вакуумом до сиропообразного состояния. К сиропу добавляют небольшое количество 50%-го водного ацетона для осаждения каротина. Органические растворители испаряются под вакуумом, а каротин выпадает в виде темно-красных кристаллов. Воде дают медленно испариться в вакуум-эксикаторе (48 час.). В чашке остается темно-красный с вишневым оттенком порошок. Его промывают сначала 60%-м, а потом чистым ацетоном. Растворитель слегка окрашивается в желтый цвет; его удаляют декантацией. Порошок каротина принимает при этом почти черную окраску с фиолетовым оттенком.

Получение каротина из листьев крапивы

Получение каротина из листьев крапивы сводится к тем же операциям, что и получение хлорофилла. При этом могут быть использованы петролейноэфирные растворы, получающиеся после осаждения хлорофиллов. После отделения хлорофилла к петролейноэфирному раствору пигментов (каротина и примеси хлорофилла) прибавляют 30%-ю метиловоспиртовую щелочь для омыления хлорофиллов и свободных липидов.

Петролейный эфир отмывают от щелочи и метанола водой. Затем раствор сушат безводным сернокислым натрием. Каротин встряхивают с алюмогелем, на котором концентрируется весь пигмент. Такой операцией достигается возможность получения концентрированного раствора каротина в небольшом объеме растворителя. Для этого каротин элюируют с алюмогеля небольшим количеством этилового эфира. Дальше операции проводятся так же, как и при получении каротина из корнеплодов моркови.

Препаративное получение лютеина

Сухая мука из крапивы листьев обрабатывается ацетоном и переводится в петролейный эфир.

В отличие от процедуры, применяемой для получения хлорофиллов, петролейноэфирный раствор пигментов следует тщательно отмыть от следов ацетона. Ацетон можно считать практически отмытым, когда петролейноэфирный раствор пигментов теряет флуоресценцию.

К раствору добавляют 80%-й метанол; после встряхивания и расслоения смеси на границе двух фаз выпадают хлопья лютеина желто-оранжевой окраски. Осадок собирается на порошке поваренной соли, добавленной в гипофазу. Вымывание лютеина 80%-м метанолом производят 10—15 раз. Порошок с осевшим на нем лютеином промывают на стеклянной воронке петролейным эфиром. Петролейный эфир отсасывают и пигменты (лютеин с примесью хлорофиллов) растворяют этиловым или метиловым спиртом. К раствору добавляют 30%-ю спиртовую щелочь и производят омыление в течение 20 мин. Лютеин переводят в этиловый эфир, из которого водой тщательно вымывают остатки щелочи и спирта. Раствор сгущают под вакуумом; к сгущенному раствору добавляют немного воды. При испарении эфира лютеин выпадает в воде в виде хлопьев оранжево-розового цвета. Воду удаляют из препарата в вакуум-эксикаторе (48 час.). О чистоте полученного препарата судят по контрольной хроматограмме.

ПРЕПАРАТИВНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ИСКУССТВЕННЫХ КОМПЛЕКСОВ

Для работ, связанных с исследованием механизма фотосинтеза, возникает необходимость получать пигменты не только в свободном, но и в связанном с высокомолекулярными соединениями состоянии, т. е. в состоянии, сходном с тем, которое имеет место в живой пластиде. Такие модельные соединения получили название искусственных пигментных комплексов. Они состоят из белкового носителя и пигментной компоненты.

В качестве белкового носителя могут быть использованы либо чистые белки (альбумины, казеины и т. д.), либо липопротеиды как животного, так и растительного происхождения; кроме того, носителями могут служить и субмикроскопические структуры клеток растений, а также этиолированные листья.

В качестве пигментной компоненты в зависимости от поставленной задачи выбирают либо чистые пигменты: хлорофиллы, феофитины, металлопроизводные феофитинов, отдельные каротиноиды, либо смесь желтых и зеленых пигментов.

Ниже будут описаны отдельные примеры получения искусственных пигментно-белково-липоидных комплексов в нашей лаборатории.

Получение носителей

Нет необходимости получать самим препараты чистых белков, производство которых налажено нашей промышленностью. Поэтому ниже мы опишем получение двух носителей — желточных зерен куриного яйца и порошка из этиолированных листьев.

Получение желточных зерен

Для получения желточных зерен необходимо сначала отделить желток куриного яйца от белка. С этой целью в известковой оболочке свежего яйца с помощью препаровальной иглы и маленьких ножниц делают отверстие диаметром 2 см; в это отверстие пускают струю водопроводной воды, которая удаляет белок, оставляя желток в его оболочке, прикрепленной к полюсам яйца посредством халаз. После того как желток отмыт от белка, пинцетом разрывают белковую оболочку и выпускают содержимое в высокий мерный цилиндр на 250 мл, в который предварительно налита вода. Сильными резкими движениями встряхивают цилиндр, благодаря чему получается равномерная суспензия желточных зерен. В желтке куриного яйца содержатся зерна двоякого рода — белые и желтые. Они различаются по своему удельному весу. Благодаря этому обстоятельству при стоянии такой суспензии происходит дифференцированное оседание: желтые зерна оседают быстрее. После полутора-двух часов стояния в темноте на дне цилиндра собираются желтые желточные зерна в виде

рыхлого осадка. Надосадочная жидкость представляет собой непрозрачную суспензию белых желточных зерен молочно-белого цвета. Эту суспензию нужно удалить. Для этого на резиновую трубку, присоединенную к водоструйному насосу, надевают стеклянную трубку с оттянутым кончиком и постепенным погружением трубки при включенном насосе отсасывают надосадочную жидкость.

Осадок желточных зерен встряхивают с новой порцией воды и снова дают ей отстояться. На этот раз осаждение зерен происходит быстрее, и через 40 минут можно операцию промывания повторить. Всего необходимо отмывку повторить 6—7 раз.

Полученные желточные зерна представляют собой микроскопические образования округлой формы, размером в 1 мк. При pH=10 происходит их полное растворение (лизирование). Суспензия при этом становится почти прозрачной, с легкой опалесценцией. Для создания комплексов можно работать как с суспензией зерен, так и с лизированными зернами. Для некоторых целей можно использовать обезжиренные желточные зерна; обезжиривание достигается обработкой суспензии этиловым эфиром.

Получение порошка этиолированных листьев

Семена злаков проращивают в рулонах из фильтровальной бумаги в течение 48 час. при комнатной температуре, после чего помещают их в темный термостат (20—25°). Семидневные проростки срезают и высушивают в термостате при температуре 30—35° до воздушно-сухого веса. Высушенные проростки измельчаются ножницами на мелкие кусочки и помещаются в эксикатор над хлористым кальцием на 72 часа, после чего растираются в ступке и просеиваются через сито с диаметром отверстия 0.4 мм.

Получение искусственного комплекса на желточных зернах

Для получения комплекса с пигментами необходимо тем или иным способом «воссоединить» их с носителем. Такого рода воссоединение, или «посадка» пигментов может быть осуществлена несколькими способами, отличающимися состоянием сажаемых пигментов. Так, пигменты могут быть в истинном растворе в полярных или неполярных растворителях, в водно-коллоидальном растворе, либо в состоянии адсорбции на твердых веществах.

Посадка пигментов из растворов в органических растворителях

Растворы пигментов в каком-либо из растворителей добавляются к суспензии желточных зерен в пробирке или колбочке Эрленмейера и встряхиваются либо вручную, либо на механи-

ческой качалке в течение 10—20 мин. После этого растворитель должен быть удален испарением под вакуумом.

При применении растворов пигментов в полярных растворителях следует учитывать опасность возможной денатурации белков комплекса. Для того чтобы избежать денатурации, следует брать небольшие по объему, но сильно концентрированные растворы пигментов. Объем добавляемых растворов пигментов должен составлять 1/15—1/10 объема суспензии желточных зерен.

Из испытанных нами различных растворителей ацетон оказался наиболее подходящим: из ацетонового раствора пигменты «садятся» быстрее и полнее всего.

Посадка пигментов из водно-коллоидальных растворов

В тех случаях, когда по тем или иным соображениям нежелательно добавление органических растворителей, посадку производят из водно-коллоидальных растворов.

Водно-коллоидальный раствор пигментов встряхивается в колбе с суспензией желточных зерен в течение получаса.

Посадка пигментов, адсорбированных твердыми телами

Если необходимо сохранить объем исходной суспензии желточных зерен, т. е. нежелательным является добавление растворителей вообще, можно производить посадку на носителей пигментов при помощи «переадсорбции». Для этого сначала осаждают пигменты на различного рода твердые тела. Лучше всего для этих целей подходит целлюлоза в виде фильтровальной бумаги; можно также в качестве первичных адсорбентов использовать древесные опилки или стружки. Раствор пигментов в петролейном эфире встряхивают с фильтровальной бумагой, нарезанной в виде полосок. После удаления растворителя бумага готова к использованию. Полоски фильтровальной бумаги с осажденными на них пигментами встряхиваются с суспензией желточных зерен в течение нескольких часов.

По окончании переадсорбции отделяют желточные зерна от бумаги и используют для работы.

Получение частично реконструированной системы

Одним из подходов к решению проблемы механизма фотосинтеза является исследование реконструированных систем. Известно, что реконструированные системы способны осуществлять ряд фотохимических реакций. Поэтому мы здесь опишем способ создания частично реконструированной системы, носителем которой являются этиолированные листья ячменя.

Раствор пигментов в петролейном эфире, содержащий все пигменты, был приготовлен следующим образом. Свежесорванные листья крапивы измельчались с 55%-м водным раствором ацетона. Полученная масса отжималась через два слоя марли. К отжатой массе приливали избыток ацетона и настаивали в течение 10—15 мин. Раствор пигментов в ацетоне переносили в делительную воронку, содержащую такой же объем петролейного эфира. После добавления воды раствор расслаивался, причем пигменты переходили в верхний петролейноэфирный слой. Ацетон из петролейного эфира удаляли многократным промыванием водой.

Для посадки пигментов 20 г порошка этиолированных листьев помещали в колбу Эрленмейера и заливали петролейноэфирным раствором пигментов. Порошок с раствором встряхивали на механической качалке в течение 3 час. Избыток петролейного эфира удаляли декантацией, а остаток его испаряли в течение 48 час. в холодильнике. Порошок с осевшими пигментами и липидами имел зеленую окраску.

ПОЛУЧЕНИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ ХЛОРОПЛАСТОВ

Все операции, связанные с получением хлоропластов, следует производить на холоду, в охлажденной посуде и на слабом свету.

Навеску листьев зеленых растений (примерно около 5 г) помещают в холодильник в полиэтиленовом мешочке на 20 мин. Туда же помещают ступку с пестиком для охлаждения. Затем листья переносят в ступку и растирают с двойным по весу количеством жидкости, имеющей осмотическое давление, близкое к таковому клеток. С этой целью можно употреблять 0.4—0.5 М раствор сахарозы или 0.3 М раствор поваренной соли.

Растертую кашицу отжимают через двойной слой полотна. Отжатую жидкость центрифугируют в течение 1 мин. при ускорении 200 g. Надосадочную жидкость сливают и центрифугируют еще раз при 1000 g в течение 10 мин.

После повторного центрифугирования надосадочную жидкость выливают, а осадок, содержащий преимущественно хлоропласты, ресуспендируют либо в смеси, взятой для приготовления хлоропластов, либо в другом растворе, который нужен исследователю.

В том случае, когда хлоропласты используют для изучения реакции фотофосфорилирования, рекомендуется употреблять для их получения следующую смесь: 0.35 М NaCl, 0.25 М аскорбата натрия и 0.02 М трис-HCl; pH раствора примерно равен 7.8.



ГЛАВА XII

ОПИСАНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ МЕТОДИК

МЕТОДИКИ, НЕ ОСНОВАННЫЕ НА ХРОМАТОГРАФИИ

Определение содержания хлорофилла в листьях

Когда говорят об определении содержания хлорофилла в листьях без особых оговорок, то обычно имеют в виду определение суммарного содержания хлорофиллов $a+b$.

Определение с помощью смеси растворителей

Для количественного определения хлорофилла достаточно взять навеску в 200—300 мг. Величина навески зависит от содержания в материале хлорофилла. В среднем содержание хлорофилла в расчете на сырой вес составляет около 2 г/кг, или 2 мг/г.

Навеску измельчают с безводным сернокислым натрием, благодаря чему одновременно достигается и фиксация.

Для ускорения взвешивания лучше пользоваться торзионными весами. Если торзионных весов нет, расчет лучше производить на листовую площадь. Для этого острым пробочным сверлом высекают из листьев, отобранных для пробы, несколько кружочков; зная диаметр сверла, рассчитывают содержание хлорофиллов на поверхность определенного числа кружочков. Если по каким-либо соображениям желательно расчет вести на единицу веса, то можно поступить следующим образом: вместо пяти кружочков взять 10 и 5 из них употребить для анализа на хлорофилл, а другие 5 взвесить в бюксе на аналитических весах.

Растертый в порошок листовой материал обрабатывается смесью этилового спирта (этанола) и ацетона в отношении 1 3, т. е.

1/4 по объему спирта и 3/4 ацетона. Извлечение можно вести в ступке. Из растертого материала указанной смесью пигменты экстрагируются очень легко. Весь порошок смывают смесью растворителей на стеклянный фильтр (№ 2—3) и отфильтровывают от осадка. Фильтрат собирают в мерную колбочку объемом 25 мл.

Концентрация хлорофилла в вытяжке определяется на фотоэлектроколориметре. Оптическую плотность определяют за красным светофильтром.

Пример расчета содержания хлорофилла в листьях

Навеска листьев	— 200 мг	Оптическая плотность	— 0.185
Объем вытяжки	— 25 мл	Коэффициент светофильтра	— 33.3
Толщина кюветы	— 1 см		

$$\text{Содержание хлорофилла} = \frac{0.185 \times 33.3 \times 25}{200 \times 1} = 77 \text{ мкг/мг, или } 77 \text{ мг/г}$$

Само собой разумеется, что описанная методика определения содержания хлорофилла не является чем-то стандартным. Критически используя изложенный в предыдущих главах материал, каждый исследователь может в соответствии с возможностями, имеющимися в его распоряжении, изменять по-своему те или иные операции. Так, например, вместо растирания с безводным сернокислым натрием можно фиксировать навеску листьев в горячей воде или водном растворе буфера, вместо смеси растворителей в указанном отношении можно извлекать отдельными чистыми растворителями или их смесью в других соотношениях. Можно также вытяжку доводить не до 25 мл, а до какого-либо другого объема, а вместо фильтрования отделить растворитель от осадка путем центрифугирования. Количество возможных комбинаций очень велико.

Определение при помощи водных растворов детергентов

При растирании листьев зеленых растений с водными растворами некоторых детергентов получаются прозрачные зеленые растворы хлорофилл-белково-липоидного комплекса.

Детергенты, как известно, являются поверхностно-активными веществами. По химическому строению они делятся на ионогенные и неионогенные. Ионогенные подразделяются на три класса: анионактивные, катионактивные и группу веществ, молекулы которых в водных растворах амфотерны.

Мы применили детергент, представляющий собой натриевые соли сульфоэфиров спиртов, получаемых восстановлением жирных кислот кокосового масла.

Листья взвешивают на торзионных весах (около 200 мг) и измельчают в фарфоровой ступке с порошком двууглекислого натрия для нейтрализации клеточного сока. К полученной массе добавляют в ступку 10 мл дистиллированной воды, после чего снова тщательно ее растирают. Получается мутный коллоидальный раствор. Его просветляют прибавлением детергента, который берется в количестве 50% от веса листьев. Просветленный раствор центрифугируют от осадка, после чего определяют оптическую плотность его на ФЭК-М за красным фильтром.

Специальными сравнительными опытами было установлено, что коэффициент, на который умножают величину оптической плотности, для детергентных растворов несколько меньше, чем для спиртово-ацетонового экстракта. Он равняется 28.6 (вместо 33.3).

Определение методом феофитинизации

При работе в полевых условиях оказывается важным собрать большое количество проб с последующим определением в условиях лаборатории. В таких случаях рекомендуется фиксировать материал в горячей уксусной или щавелевой кислоте.

Методика определения содержания хлорофилла в листьях состоит из следующих операций.

Взвешенные на торзионных весах листья обрабатывают в фарфоровой чашечке 5%-й уксусной горячей (95°) или щавелевой кислотой. При этом происходит быстрое побурение (феофитинизация). Реакция феофитинизации заканчивается за 5 мин. Побуревшие листья стеклянной палочкой или пинцетом из нержавеющей стали извлекают из чашечки, обмывают водой и раскладывают на фильтровальную бумагу для подсушивания. Высушенные листья помещают в пакетики, и в таком виде они могут храниться весьма длительное время. Последующее определение содержания в них феофитина позволяет рассчитать содержащийся в листьях хлорофилл.

Поскольку феофитин почти нерастворим в этиловом спирте, извлечение его из листьев следует производить ацетоном с добавлением небольшого количества этилового эфира. С этой целью высушенные листья растирают с небольшим количеством стеклянного песка в фарфоровой ступке. Полученный порошок заливают небольшими порциями указанного растворителя, который извлекает полностью феофитин. Экстракт фильтруют через стеклянный фильтр № 3 и фильтрат собирают в мерную колбочку.

Определение оптической плотности производится на ФЭК-М за красным светофильтром. Концентрация пигмента определяется по калибровочной кривой.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЖЕЛТЫХ ПИГМЕНТОВ В ЛИСТЬЯХ

Определение содержания каротина

Взвешенная порция листьев обезвоживается растиранием с сернокислым натрием. Количество сернокислого натрия, необходимое для растирания одной порции, зависит как от величины последней, так и от содержания в ней воды. Следует его брать в 10—20-кратном количестве. Опыт показывает, что избыток сернокислого натрия не действует на ход анализа, поэтому нет необходимости брать его точно по весу. Растирание производится тщательно в течение 10—15 мин. При плохо растертом материале затягивается время извлечения и снижается точность анализа.

Ступка и пестик должны быть совершенно сухими. Если ступка влажная, то сернокислый натрий прилипает к стенке ступки так плотно, что его почти невозможно отделить.

Само растирание производится следующим образом. Около половины необходимого количества сернокислого натрия высыпают в ступку, сверху кладут взятую навеску, которую засыпают оставшимся количеством реактива. Предварительно следует взятую навеску немного растолочь, т. е. постучать по ней пестиком несколько раз сверху вниз. Это делается для того, чтобы основное количество воды, содержащейся в листе, сразу поглотилось сернокислым натрием и тем самым создались условия, затрудняющие действие ферментов. Растирать затем следует равномерно, не прилагая большой силы и время от времени помешивая полученный порошок. Хорошо растертый материал должен представлять собой однородный, сухой, легко сыпучий порошок светло-зеленого цвета.

Приготовленный таким образом порошок подвергается обработке бензином. Для извлечения каротина может быть использован бензин как низких, так и высоких фракций. Бензин не должен содержать следов спирта или ацетона. Следы спирта или других поверхностноактивных веществ способствуют переходу хлорофилла в раствор.

Наливают бензин (4—5 мл) в ступку с порошком. Получившуюся кашицу ярко-зеленого цвета растирают 2—3 мин., после чего к ней прибавляют еще 40 мл бензина и растирают еще 1—2 мин. Бензин удаляют декантацией. Операция повторяется несколько раз. Обычно после 3—4 раз раствор бензина уже бесцветен.

Вместо того чтобы извлекать каротин в ступке, можно произвести экстракцию на стеклянном фильтре. Для этого порошок переносят на фильтр, в который наливают 5 мл бензина. Полученная кашица перемешивается стеклянной палочкой. Затем прибавляют еще несколько миллилитров бензина и после нескольких

минут настаивания отсасывают его путем подключения колбы к насосу. Экстрагируют до тех пор, пока последние капли бензина не будут бесцветны.

Все экстракты собирают воедино, объем измеряют, и определяют оптическую плотность на ФЭК-М за синим фильтром.

Определение суммы ксантофиллов

После извлечения каротина в материале остаются связанные с липопротеидным комплексом хлорофилл и сумма ксантофиллов: лютеин, виолаксантин и неоксантин. Для извлечения этих пигментов и их количественного определения поступают следующим образом.

Если извлечение каротина производится в ступке, то к оставшемуся материалу прибавляют 10 мл ацетона со спиртом (3 1) и растирают его в течение 2—3 мин. Раствор декантируют и к остатку добавляют новую порцию растворителя. Извлечение повторяют до обесцвечивания материала.

Если анализ ведется на фильтре, к остатку после извлечения бензином каротина приливают несколько миллилитров спиртового ацетона и, помешивая стеклянной палочкой, дают настояться в течение нескольких минут. Затем при легком отсасывании извлекают оставшиеся пигменты. Эта операция повторяется 2—3 раза до полного обесцвечивания сернокислого натрия.

Присутствие в растворе ксантофиллов не мешает количественному определению хлорофилла. Определение же суммы ксантофиллов может быть произведено лишь после того, как от них будет отделен хлорофилл.

Измеряют объем слитых вместе фракций, после чего раствор делят на две части. В одной измеряют оптическую плотность за красным фильтром, а другую подвергают омылению.

Для этого берут кусочек твердого едкого кали (около 1 г) и помещают в небольшую сухую колбочку. Туда же приливают порцию спиртово-ацетоновой вытяжки, предназначенную для омыления. Омыление ведется в течение 20 мин. в темноте при встряхивании. При омылении образуются калиевые соли хлоринов, растворимые в воде. После омыления в колбочку приливают несколько миллилитров бензина и сливают тройную смесь (спирт—бензин—ацетон) в делительную воронку. Затем в колбочку снова приливают 4—5 мл бензина для того, чтобы сполоснуть щелочь, и эту порцию приливают к раствору в делительной воронке. К смеси растворителей добавляют 1—2 мл воды и воронку сильно встряхивают. Происходит быстрое расслоение без образования эмульсий. Верхний бензиновый слой содержит ксантофиллы, а нижний водно-спиртово-ацетоновый содержит соли хлоринов. Отделяют нижний слой и повторяют операцию по извлечению ксантофиллов. Для этого прибавляют к водно-

спиртово-ацетоновой фракции 4—5 мл бензина и 1—2 мл воды, сильно встряхивают и снова дают расслоиться. Верхний бензиновый раствор приливают к основному бензиновому раствору. Операцию повторяют до полного извлечения ксантофиллов, о чем можно судить по отсутствию окрашивания бензина. Иногда раствор ксантофиллов получается непрозрачным, для его просветления достаточно прибавления нескольких капель ацетона.

Оптическую плотность определяют за синим светофильтром. Здесь следует оговориться, что суммарное определение ксантофиллов влечет за собой некоторую ошибку, так как для отдельных ксантофиллов имеются различные коэффициенты поглощения. Так как из трех ксантофиллов около 50% приходится на лютеин и около 50% на оба других ксантофилла, то можно для сравнительных исследований воспользоваться средневзвешенным коэффициентом. Для более точных исследований, как например исследования механизма фотосинтеза, нужно пользоваться методикой, позволяющей определять раздельно индивидуальные ксантофиллы.

Используя приведенные в этом разделе методики, исследователь может решать целый ряд вопросов. Так, например, определяя содержание каротина и хлорофилла, можно сравнить кормовую ценность того или иного растения.

МЕТОДИКИ, ОСНОВАННЫЕ НА ХРОМАТОГРАФИИ НА БУМАГЕ

Хроматография на бумаге позволяет не только произвести качественное разделение пигментов пластид, но и определить количество их на хроматограмме.

Количественное определение каротина

Величину навески и объем вытяжки следует подбирать таким образом, чтобы на бумагу в конечном счете наносилось около 10 мкг каротина. Ориентировочно можно рекомендовать экстрагирование навески в 200—500 мг 20—25 мл спирта и ацетона.

Навеску тщательно растирают с безводным сернокислым натрием. В тех случаях, когда анализируется объект с высоким содержанием кислот в клеточном соке, для их нейтрализации прибавляют немного мела. Растертый порошок переносят на стеклянный фильтр и настаивают в течение 5 мин. с 5 мл смеси спирта и ацетона (2 1). Зеленый экстракт отсасывают под вакуумом в пробирку, вставленную в колбу Бунзена. Для окончательного извлечения пигментов порошок промывают несколькими порциями этилового эфира.

Объем вытяжки измеряют в мерной колбочке.

Отделение каротина от других пигментов производят на листе хроматографической бумаги № 1 («Крабовое основание»), размером 16×16 см. Для этого определенный объем (1— 2 мл) пипеткой наносят на бумагу в виде полосы шириной 5 см на расстоянии 1—2 см от нижнего края.

Бумагу с нанесенной на ней вытяжкой подсушивают на воздухе до полного испарения растворителя, свертывают в полый цилиндр и помещают в стеклянную банку, на дно которой налито 10—20 мл петролейного эфира. На время хроматографирования банку прикрывают притертой крышкой и накрывают мешочком из темной материи. Во избежание вымывания каротина из стартового пятна уровень растворителя должен быть ниже нижнего края пятна. Растворитель, поднимаясь по бумаге кверху, извлекает из пятна только каротин.

После того как каротин отделится от других пигментов на 2—3 см, хроматографирование прекращают. Полоску бумаги с содержащимся на ней каротином отделяют от остальной части листа и разрезают на небольшие кусочки. Извлечение каротина из бумаги производят в маленьком стаканчике или на стеклянном фильтре. 2—3 капли этилового эфира прибавляют для элюции каротина, после чего его полностью извлекают с бумаги несколькими порциями смеси спирта с ацетоном (1 : 3). Раствор каротина доводится в мерной колбе до 10 мл. Оптическую плотность определяют за синим светофильтром.

О том, насколько полно снимается с бумаги каротин, можно судить по данным следующего опыта. На бумагу в месте стартового пятна наносится определенное количество чистого каротина. Затем восходящим током петролейного эфира каротин поднимается по бумаге, извлекается указанным выше способом. Определяется его оптическая плотность.

Нанесено каротина, мкг	Обнаружено каротина, мкг	%
16.2	15.1	93.5
13.3	13.2	98.8
16.3	15.6	98.3
11.8	11.4	95.8
14.3	14.1	98.6
10.0	9.4	94.0
11.8	11.0	93.6
10.2	10.1	99.0

С бумаги извлекается не меньше 93% наносимого на нее каротина.

Известно, что ошибка измерения на оптических приборах составляет обычно около 10%, т. е. перекрывает ошибку хроматографирования.

Количественное определение основных каротиноидов зеленых листьев

Описываемая ниже методика позволяет определить количественно основные каротиноиды зеленых листьев: каротин, лютеин, виолаксантин и неоксантин. Из этих четырех каротиноидов неоксантин находится в минимальном количестве. Если принять сумму каротиноидов за 100%, то на долю неоксантина в среднем приходится 10—15%.

Это обстоятельство приходится учитывать при выборе величины навески и объема экстрагируемого растворителя.

Полученная вытяжка хроматографируется на бумаге. Определенный объем вытяжки пигментов наносится с помощью пипетки на место стартового пятна. Этот объем зависит от концентрации пигментов в вытяжке и колеблется от 2 до 5 мл. Каротин, лютеин и виолаксантин определяются на одной хроматограмме, а неоксантин — на другой.

Первая хроматограмма разгоняется смесью бензола и петролейного эфира в объемном отношении 3 : 1. Разгонка второй хроматограммы производится смесью бензола, петролейного эфира и этанола (96°) в объемных отношениях соответственно 18 : 6 1. Хроматограммы разгоняются в течение 30—45 мин.

Таблица 5

Анализ каротиноидов в листьях цикламена
(*Cyclamen persicum* L.)

Дата	Сумма каротиноидов, мг/г сырого веса	Содержание каротиноидов, % от суммы			
		каротин	лютеин	виолаксантин	неоксантин
19 III	273.8	25.6	35.8	22.3	16.3
	263.3	27.1	35.2	21.7	16.1
20 III	301.6	27.1	39.2	16.8	17.0
	292.9	26.4	39.4	17.1	17.1
21 III	269.4	26.1	35.8	21.1	17.1
	276.6	25.9	38.1	18.9	17.0
23 III	267.6	25.4	38.1	18.3	18.3
	277.8	26.6	38.1	17.4	17.8
27 III	316.3	25.7	37.0	20.2	16.8
	319.7	24.6	38.5	20.0	17.0
28 III	278.2	27.4	34.4	22.6	15.8
	285.9	26.1	34.0	22.7	17.3
29 III	298.2	24.9	37.6	19.3	18.2
	293.1	25.3	38.0	20.4	16.3
30 III	291.7	25.9	38.4	18.4	17.2
	296.5	28.2	38.7	17.0	16.1
3 IV	283.3	26.6	38.4	17.5	17.5
5 IV	261.9	25.9	39.6	17.2	17.4
	247.2	26.6	39.5	18.1	15.7

При помощи этой методики были проделаны количественные определения каротина, лютеина, виолаксантина и неоксантина в листьях целого ряда растений. В табл. 5 приведены результаты анализов, произведенные на листьях цикламена.

Необходимо обратить внимание на то обстоятельство, что указанные в методике отношения растворителей, служащих для разгонки отдельных пигментов, были подобраны эмпирическим путем в определенных условиях и на определенной бумаге.

Оптимальное отношение определяется температурой окружающей среды и объемом хроматографической банки. Эти два условия определяют то реальное соотношение растворителей, которое устанавливается при достижении равновесия между двумя фазами — жидкой и газообразной. Так как смесь состоит из двух растворителей с различными точками кипения, то концентрация петролейного эфира, более низко кипящего, может сильно изменяться в зависимости от температуры и объема банки. При этом нужно руководствоваться следующим правилом: доля петролейного эфира в смеси растворителей должна быть тем больше, чем выше температура и больше объем банки. Перед началом работы рекомендуется опытным путем установить оптимальные соотношения указанных растворителей.

В нашей лаборатории были испытаны различные сорта бумаги. Наиболее подходящей оказалась бумага № 1 «Крабовое основание».

Количественное определение хлорофиллов *а* и *б*

При решении ряда физиологических, биохимических и экологических задач возникает необходимость определения не только суммарных количеств зеленых пигментов пластиды, но и их отдельных компонентов. При проведении такого рода исследований необходимо хроматографическое разделение этих пигментов, так как в спиртовой или ацетоновой вытяжках наряду с хлорофиллами зачастую могут присутствовать также и хлорофиллиды, имеющие в видимой части спектра такое же поглощение, что и хлорофиллы. Ниже будет описана методика количественного определения хлорофиллов *a* и *b* при помощи хроматографии на бумаге.

Навеска листьев в 1—2 г растирается в смеси ацетона с этанолом (96%-м) в объемных соотношениях 3 : 1 при добавлении небольшого количества соды и стеклянного песка. Для быстрой инактивации ферментов можно рекомендовать предварительную фиксацию навески в охлажденном ацетоне.

Полученную кашицу фильтруют через стеклянный фильтр № 2; осадок на фильтре промывают 2—3 раза той же смесью ацетона со спиртом; объем вытяжки доводят в мерной колбе до 25 мл. 1—2 мл зеленого раствора при помощи калиброванной пипетки

наносят на хроматографическую бумагу размером 13×16 см. Бумагу свертывают в виде полого цилиндра высотой в 13 см и помещают в сосуд для хроматографирования. В сосуд предварительно наливают 20 мл смеси петролейного эфира с этиловым спиртом (96%-м). Объемные отношения этих растворителей могут колебаться от 20 1 до 20 1.5, т. е. концентрация спирта в петролейном эфире может колебаться от 5 до 7.5%.

Разделение хлорофиллов *a* и *b* производится восходящим током смеси растворителей. Время, необходимое для разделения, составляет 20—30 мин. После того как наступит полное разделение хлорофиллов *a* и *b*, бумагу вынимают из банки, ножницами вырезают полоски с соответствующими пигментами и каждую полоску нарезают мелкими кусочками в маленькие химические стаканчики. Элюция хлорофиллов производится сначала небольшим количеством этилового эфира, затем пигменты смываются смесью ацетона и этанола в мерную колбочку объемом в 10 мл. Определение оптической плотности производится за красным светофильтром на ФЭК-М. При указанном способе хроматографирования хотя хлорофиллы и разделяются друг от друга, но каждый из хлорофиллов может оказаться не отделенным от каротиноидов. Однако это обстоятельство не сказывается на оптической плотности хлорофилла, так как определение производится за красным светофильтром, т. е. в той области спектра, где каротиноиды не поглощают.

Для демонстрации устойчивости хлорофиллов в условиях хроматографирования был поставлен ряд опытов.

В первой серии опытов растворы хлорофиллов *a* и *b* определенной концентрации раздельно наносились на листы бумаги и хроматографировались описанным выше способом. После элюции пигменты фотометрировались (табл. 6).

Таблица 6

Сопоставление количеств хлорофиллов *a* и *b* (в мг/мл) до и после хроматографирования

Хлорофилл *a*		Хлорофилл *b*	
до хроматографирования	после хроматографирования	до хроматографирования	после хроматографирования
61.7	61.7	36.3	36.3
61.5	61.4	35.3	35.9
61.1	61.1	36.6	36.6
61.2	61.2	36.3	36.3
61.4	61.4	36.6	36.6
Среднее . 61.4±0.2	61.4±0.2	36.2±0.4	36.3±0.2

Вторая серия опытов была поставлена таким образом, что на хроматографическую бумагу наносилась смесь хлорофиллов *a* и *b* определенной концентрации и затем пигменты хроматографировались. После разделения пигменты элюировались и каждый из них фотометрировался (табл. 7).

Таблица 7

Сопоставление суммы хлорофиллов *a* и *b* (в мг/мл) до и после хроматографирования

Сумма хлорофиллов *a* и *b* до хроматографирования	Количество хлорофиллов после хроматографирования		Сумма хлорофиллов после хроматографирования (вычисленная)
	a	*b*	
44.6	32.8	11.6	44.4
44.0	33.2	10.6	43.8
44.0	32.7	11.6	44.3
43.6	32.7	10.6	43.3
43.6	32.0	11.3	43.3
43.6	32.8	10.6	43.4
43.6	33.2	10.1	43.3
Среднее . 43.8+0.3	32.8+0.3	10.9+0.5	43.7+0.5

Как видно из приведенных данных, наблюдаемые различия между прямым фотометрированием до хроматографирования и после хроматографирования лежат в пределах ошибки опыта.

Несколько иначе обстоит дело при работе с зеленой вытяжкой (табл. 8).

Таблица 8

Содержание хлорофиллов в вытяжке из листьев цикламена (мг/мл) определяемое прямым фотометрированием и при помощи хроматографирования

Прямое фотометрирование	Хроматографирование			Прямое фотометрирование	Хроматографирование		
a+*b*	*a*	*b*	*a*+*b*	*a*+*b*	*a*	*b*	*a*+*b*
Опыт № 1				Опыт № 2			
25.5	19.1	5.3	24.4	50.4	34.5	12.1	46.6
25.0	17.9	5.6	23.5	50.6	34.5	12.4	46.9
25.4	18.4	5.3	23.7	50.4	35.2	12.9	48.1
—	18.2	5.9	24.1	—	35.0	12.1	47.1
—	17.9	5.9	23.8	—	34.3	12.2	46.5
—	18.2	5.1	23.3	—	34.3	11.7	46.0
				—	35.3	11.7	47.0
Среднее 25.3	18.3	5.5	23.8	Среднее . 50.5	34.7	12.2	46.9

Как видно из табл. 8, величина суммы хлорофиллов $a+b$ после хроматографирования несколько ниже величины, определенной прямым фотометрированием. Исследование вытяжки показало, что в ней наряду с хлорофиллами содержались и хлорофиллиды, остающиеся после хроматографирования в стартовом пятне.

На основании сказанного становится ясным, что при определении на фотоэлектроколориметре или на спектрофотометре оптические плотности хлорофиллидов суммируются с оптической плотностью хлорофиллов. В результате этого прямое фотометрирование вытяжки может привести к получению завышенных данных.

В приводимой ниже табл. 9 сведены данные анализа хлорофиллов *a* и *b* в листьях некоторых растений с помощью метода хроматографии на бумаге.

СПЕЦИАЛЬНАЯ МЕТОДИКА

Количественное определение пигментов в одноклеточных зеленых водорослях

Ниже описана методика количественного определения пигментов пластиды в клетках одноклеточной водоросли *Chlorella pyrenoidosa* Chick. Эта методика была испытана на ряде других видов, в том числе *Ch. vulgaris* Bejer., *Ch. ellipsoidea* Gerneck, *Scenedesmus* sp.

В отличие от методик определения пигментов в листьях зеленых растений при работе с водорослями возникают дополнительные трудности, связанные с выбором единицы, на которую следует пересчитывать количество пигментов в материале. Так, например, оказывается невозможным взять точную навеску исходного материала. Это вызывает необходимость выбрать такой показатель, который бы позволил сравнимым образом вести расчет содержания пигментов в материале.

В качестве такого показателя может служить определенный объем исходной суспензии. Разные суспензии водорослей могут содержать различное количество клеток; поэтому этот показатель может быть применен лишь для сравнительных определений, например, когда на данной суспензии исследуется действие того или иного фактора на содержание пигментов.

Другим показателем может быть количество клеток как в единице объема исходной суспензии, так и в известном объеме отцентрифугированных клеток. Этот показатель позволяет сопоставлять количество пигментов в различных суспензиях.

Наконец, можно рассчитать количество пигментов на единицу сухого веса.

Таблица 9

Содержание хлорфиллов *a* и *b* в листьях различных растений, обнаруженное методом хроматографирования на бумаге

Растение	Навеска листьев, мг	Содержание хлорофиллов, мг/г сырого веса	
		a	*b*
Aspidistra elatior	774	1420	524
	761	1540	564
	785	1410	561
	859	1470	577
	765	1520	579
	762	1390	496
	Среднее .	1460+5	547+3
Ficus elastica	1445	649	245
	1432	710	262
	1461	707	265
	1442	655	239
	1433	664	241
	1468	624	237
	Среднее .	670+27	248+10
Vitis Woineriana	1175	664	252
	1185	665	248
	1156	660	245
	1149	685	—
	1144	668	
	Среднее .	668+7	248+2
Musa sp.	510	1880	606
	516	1900	570
	527	1770	589
	554	1750	556
	557	1700	—
	546	1720	—
	Среднее .	1790+7	582+17

В тех случаях, когда исследователь заинтересован лишь в определении содержания каротиноидов, можно проводить расчет на единицу хлорофилла, т. е. количество каротиноидов следует разделить на количество хлорофиллов.

Определенный объем суспензии водорослей (10 мл) центрифугируется при 3000—4000 оборотов ($\approx$1000 g) в течение 5 мин. Надосадочную жидкость сливают; в случае необходимости отмывания от солей питательного раствора клетки ресуспендируют в дистиллированной воде и снова центрифугируют. Осадок водорослей после центрифугирования встряхивается в центрифужной пробирке с небольшим объемом (0.5—1.0 по объему центрифугированных клеток) метанола при комнатной температуре. В случае необходимости быстрой фиксации материала встряхивание производится в горячем метаноле. Полученная кашица переносится в фарфоровую ступку и тщательно растирается со стеклянным песком. Стеклянный песок берется в количестве 10—20 г. Растирание производится до испарения метанола. Полученный сухой порошок зеленовато-желтой окраски переносится на стеклянные фильтры №№ 3 и 4 и заливается небольшим количеством метанола (2 мл). Извлечение пигментов ведется при небольшом разрежении путем повторного добавления метанола. Все пигменты извлекаются 10 мл растворителя.

Определение пигментов в хлоропластах

Так как количественно выделить хлоропласты из листьев почти невозможно вследствие необходимости фракционного разделения, то вести расчет пигментов на единицу исходного материала еще труднее, чем в случае одноклеточных водорослей.

При сравнительных анализах в исследуемой суспензии можно вести расчет на единицу объема суспензии. Для сравнения содержания пигментов в различных суспензиях необходимо рассчитывать либо на белковый азот, либо на единицу веса хлоропластов. В том случае, когда исследователь заинтересован лишь в анализе каротиноидов, расчет можно вести на единицу хлорофилла.

Извлечение производится с помощью спирта и ацетона с большой легкостью. Определенный объем суспензии хлоропластов заливается 10-кратным объемом растворителя. Извлеченные пигменты фильтруются.

Если в дальнейшем ходе работы требуется хроматографирование вытяжки, то поступают иначе. Суспензия хлоропластов высушивается безводным сернокислым натрием, после чего извлечение ведется обычным способом. Это позволяет получить более концентрированную вытяжку, что облегчает дальнейшее хроматографирование, так как, с одной стороны, отпадает необходимость перевода в эпифазный растворитель, а с другой стороны, сокращается время высушивания хроматограммы.

Определение пигментов в искусственных комплексах

Приемы определения пигментов в искусственных комплексах принципиально ничем не отличаются от приемов определения их в хлоропластах.

Методики изучения фитохромопротеидного комплекса

Исследование извлекаемости хлорофилла смесью полярного и неполярного растворителей

С помощью описываемой ниже методики можно получить представление о количественном соотношении различных форм комплекса хлорофилла с белками. Для этого необходимо установить четыре кардинальные точки (см. главу IV).

Устанавливают концентрацию спирта в петролейном эфире, при которой начинается извлечение хлорофилла (1-я кардинальная точка). Хорошо усредненная навеска листьев исследуемого растения растирается в ступке со смесью спирта в петролейном эфире. Для навески в 50 мг достаточно взять 20—25 мл растворителя. Растирание ведут при комнатной температуре в течение 30—40 сек. без добавления порошковидных веществ; для нейтрализации клеточного сока необходимо прибавить к листовому материалу несколько капель насыщенного раствора двууглекислого натрия. Затем растворитель декантируют, замеряют его объем и после фильтрования определяют наличие в нем хлорофилла по флуоресценции. Нельзя допускать значительного испарения растворителей. О последнем судят по уменьшению объема слитого растворителя по сравнению с приливаемым объемом; это уменьшение не должно превышать 10%. Так как петролейный эфир испаряется быстрее спирта, то значительное уменьшение объема может привести к относительному увеличению концентрации спирта в смеси растворителей.

В том случае, если хлорофиллы извлекаются чистым петролейным эфиром, как это имеет место, например, у хвойных растений, 1-я кардинальная точка будет в начале осей координат. Для большинства растений эта точка лежит между 0 и 0.2% спирта в петролейном эфире.

Далее берут серию навесок листьев и в каждой отдельно определяют процент извлеченного хлорофилла при различных концентрациях спирта. Каждую навеску обрабатывают спиртом особой концентрации и каждый раз определяют процент извлеченного хлорофилла. Процент извлеченного хлорофилла вычисляют по формуле

$$\frac{M}{M+X}100,$$

где M — количество хлорофилла, извлеченного смесью полярного и неполярного растворителей, а X — количество хлорофилла, оставшегося в листе после этого экстрагирования, оно определяется извлечением смесью спирта с ацетоном в объемном отношении 1 : 3.

Полученная серия точек наносится на миллиметровую бумагу в систему координат, по оси абсцисс которой откладывается концентрация спирта в петролейном эфире, а по оси ординат — процент извлекаемого хлорофилла. При исследовании кривой можно заметить момент, когда увеличение концентрации на одну ступень (0.1%) не приводит к увеличению процента извлекаемости. Это и будет положение 2-й кардинальной точки. Положение 2-й кардинальной точки соответствует у разных растений 0.3—0.6%-й концентрации спирта.

Таким же способом устанавливают ту концентрацию спирта, при которой происходит скачок извлекаемости. Эта концентрация равняется у разных растений 0.4—0.8%. Положение 3-й кардинальной точки по существу является решающей в определении разных форм хлорофилл-белково-липоидного комплекса; она фактически характеризует количественное соотношение этих форм.

Положение 4-й точки определяется той минимальной концентрацией спирта, которая приводит к полному извлечению хлорофилла. Последняя для разных растений варьирует между 0.7 и 1.4%.

Исследование извлекаемости хлорофилла чистым петролейным эфиром после действия повреждающих факторов

Воздействие повышенной температурой. Хорошо усредненная порция листьев подвергается воздействию определенной температуры путем помещения в фосфатный буфер при pH > 7. Такой буфер следует применять во избежание феофитинизации хлорофилла. pH буфера определяется степенью кислотности клеточного сока исследуемого объекта. Для большинства объектов наиболее подходящим оказался буфер с pH$=10$.

Степень повреждающего действия при такого рода обработке определяется двумя параметрами: температурой и длительностью ее воздействия.

Выбор того или иного параметра полностью определяется, с одной стороны, природой объекта, а с другой стороны, поставленной исследователем задачей.

В общем виде можно утверждать, что листья с более нежным эпидермисом следует подвергать более кратковременному воздействию менее высоких температур. В массовых исследованиях



Рис. 39. Осветительная установка.

следует рекомендовать следующие параметры: 100° и 1 минута воздействия. При воздействии температурами 60—80° время воздействия следует увеличить до 2—5 мин. В некоторых случаях (листья с очень жестким эпидермисом и т. п.) можно удлинять время воздействия 100° до 2—5 мин.

При работе с каждым новым объектом необходимо выбрать подходящие параметры. О пригодности выбранной температуры и времени воздействия можно следить по контрольным хроматограммам.

После термического воздействия листья отделяют от буфера, тщательно отмывают холодной водой и осторожно высушивают в темном и сухом помещении при комнатной температуре.

Высушенные листья хорошо измельчают и из листовой муки берут навеску 150—100 мг. Пробу растирают с петролейным эфиром до прекращения извлечения. Раствор пигмента сливают, а остаток листьев обрабатывают смесью спирта и ацетона.

В обеих порциях определяют количество хлорофилла и вычисляют процент извлеченного петролейным эфиром пигмента по отношению к сумме обеих порций.

Если материала много, то сумму хлорофилла проще определить в другой навеске.

Воздействие других повреждающих факторов. Определение извлекаемости хлорофилла чистым петролейным эфиром после действия таких повреждающих факторов, как ультразвуковые колебания, ультрафиолетовое излучение и т. п., сводится по существу к тем же операциям, в результате которых устанавливается количество извлеченного хлорофилла, характеризующее стабильность той или иной формы комплекса. Различие сводится лишь к способу воздействия. Описание таких способов не входит в содержание настоящей книги.

Методика изучения реакции фотосинтетического фосфорилирования

Объектами для исследования реакции фотосинтетического фосфорилирования могут служить хлоропласты, выделенные из листьев разных растений (шпинат, горох, сахарная и листовая свекла и др.). При проведении опытов в зимнее время активные хлоропласты получают из верхушечных листьев 8—10-дневных проростков гороха, выращенных на растворе Кноппа ($^1/_2$ дозы).

Хлоропласты, изолированные по способу, указанному выше, суспендируются в растворе того же состава, который использовали для выделения; на 5 г листьев исходного материала приходится 2 мл раствора. Не рекомендуется оставлять суспензию в течение длительного времени даже на холоду.

0.3 мл полученной суспензии приливают к 2.7 мл реакционной смеси в конической колбочке объемом 25—50 мл. Колбочку освещают снизу на осветительной установке (рис. 39).

Температура водяной бани 14—15°. Освещенность 20—40 тыс. люксов. Длительность экспозиции 10—15 мин.

Уровень фотосинтетического фосфорилирования определяют по убыли неорганического фосфата в пробах, находившихся на свету, по отношению к контролю.

По окончании опыта из колбочки берут по 0.3 мл смеси и вносят в заранее подготовленные пробирки, содержащие раствор состава: 9.5 мл воды, 0.15 мл 60%-й хлорной кислоты и 0.15 мл 1%-го амидола, растворенного в 20%-м бисульфите натрия; последний реактив готовится растворением 2 г чистого амидола и 40 г бисульфита натрия в 200 мл дистиллированной воды.

0.15 мл водного 8.3%-го раствора молибдата аммония добавляют в каждую пробу с таким расчетом, чтобы время, за которое совершается окрашивание, было одинаковым (последнее условие необходимое соблюсти, так как с удлинением срока усиливается синяя окраска).

ПРИЛОЖЕНИЕ

Как и при всяком биохимическом исследовании, успешное решение той или иной задачи изучения пигментов в большой мере зависит от чистоты реактивов и растворителей, от возможности замены одного реактива другим, от способов подготовки смеси растворителей и т. д. и т. п.

РАСТВОРИТЕЛИ

Наиболее употребительными растворителями при работе с пигментами являются ацетон, петролейный эфир, бензол, этиловый эфир, хлороформ, сероуглерод, бензин, гексан.

Растворители, поступающие со склада, не всегда удовлетворяют тем требованиям, которые предъявляются к ним при работе с пигментами. Очень часто в лабораторию поступает технический ацетон; в таком ацетоне содержатся в растворе примеси органических веществ. Если нет чистого ацетона, необходимо технический ацетон перед употреблением перегнать. При перегонке ацетона необходимо помнить о двух обстоятельствах: во-первых, его нужно перегонять на водяной бане и, во-вторых, во избежание концентрирования в колбе растворенных веществ необходимо после отгонки очередной порции колбу, из которой ведется отгонка, освободить от содержимого и промыть ее чистым ацетоном. Если не принимать этих мер предосторожности, то ацетон получится загрязненным, а в колбе скопятся осмоленные продукты.

Для особенно ответственных операций, как например получение особо чистых препаратов, рекомендуется перегонять ацетон дважды.

Петролейный эфир следует также перегонять на водяной бане. Так как петролейный эфир является эпифазным растворителем, то его следует перед перегонкой отмыть в делительной воронке водой, после чего высушить его при помощи безводного сернокислого натрия. В случае загрязнения петролейного эфира «ароматикой» следует промыть его 50%-й серной кислотой. В тех

случаях, когда известно, что петролейный эфир загрязнен лишь пигментами, то его можно очистить при помощи адсорбентов, благодаря чему можно избежать перегонки. Наиболее подходящим для этой цели адсорбентом является алюмогель.

Сушка растворителя, содержащего небольшое количество воды, производится либо фильтрованием через слой безводного сернокислого натрия, либо встряхиванием в делительной воронке с указанным реактивом.

Если в лаборатории нет безводного сернокислого натрия, то его следует приготовить самим. Для приготовления этого реактива нужно глауберову соль растворить в горячей дистиллированной воде и в горячем же виде профильтровать через складчатый фильтр. Фильтрат следует выпарить досуха. Во избежание разбрызгивания соли необходимо выпаривание вести сначала при сильном нагревании, а последние порции воды удалить при слабом нагревании и постоянном помешивании. После того как соль станет совершенно сухой (наощупь), ее переносят в фарфоровую чашку и, помешивая, прокаливают на песчаной бане. Прокаленному сернокислому натрию дают остыть и затем растирают его в порошок и просеивают через мелкое сито (0.25 мм), после чего высыпают в стеклянную банку с притертой пробкой. Следует помнить, что сернокислый натрий поглощает не пары воды, а лишь капельно-жидкую воду.

Для правильного приготовления смеси растворителей необходимо учитывать взаимную растворимость той или иной пары растворителей. Некоторые из растворителей смешиваются друг с другом в любых соотношениях, а некоторые из них способны раствориться лишь в определенных количествах. Так, например, петролейный эфир можно смешать в любых соотношениях с ацетоном, бензолом, этиловым спиртом, чистым метанолом и 96%-м этанолом, а с водой он не только не смешивается, но даже в ней и не растворяется. Этим свойством петролейного эфира можно воспользоваться для отмывки его от таких полярных растворителей, как метанол и этанол. Водой нельзя отмыть от петролейного эфира бензол.

80%-й метанол не смешивается с петролейным эфиром.

Смесь из спирта, серного эфира и воды можно приготовить, если слить по одному объему каждого из этих растворителей в делительную воронку и сильно встряхнуть; при этом не происходит расслоения на две фазы и смесь остается стойкой.

При хроматографировании на бумаге очень часто приходится иметь дело с приготовлением смеси петролейного эфира и бензола. Эти два растворителя смешиваются во всех отношениях. В зависимости от температуры и объема хроматографического сосуда приходится готовить смеси этих двух растворителей в разных пропорциях.

Для того чтобы приготовить смесь бензола и петролейного эфира в отношении 3 : 1, необходимо взять три объема бензола и один объем петролейного эфира. Для этой цели нужно измерить общее количество смеси, которое должно наполнить хроматографический сосуд до необходимой высоты. Скажем, для данной банки достаточно налить 40 мл смеси; в этом случае берут мерный цилиндр на 50 мл и отмеряют им 30 мл бензола, который затем выливают в банку. После этого отмеряют 10 мл петролейного эфира и сливают туда же; растворители хорошо перемешивают и накрывают банку притертой крышкой. Так как петролейный эфир испаряется легче, чем бензол, то нельзя заранее готовить смесь; при стоянии соотношение компонентов может значительно измениться.

АДСОРБЕНТЫ

Основное качество, которым должны обладать адсорбенты,— их однородность; это относится как к бумаге, так и к порошковидным адсорбентам.

Бумага для хроматографии должна быть по возможности однородной. Это означает, что равные поверхности бумаги должны обладать одинаковым весом. Проверить однородность бумаги можно и по ее адсорбционной емкости. Равные площади бумаги должны адсорбировать одинаковые количества пигментов. Это устанавливается следующим образом. На исследуемую бумагу наносят равные объемы вытяжки из листа, после чего разгоняют пигменты в восходящем токе петролейного эфира и бензола. Измеряют площади, занимаемые хлорофиллами, и если размеры площадей совпадают или очень близки, бумагу следует считать однородной.

Крахмал, сахарную пудру и другие порошковидные адсорбенты следует просеивать через сито, чем достигается бóльшая однородность.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАКТИВОВ

Фосфатный буфер

Буфер готовится из смеси двух фосфорнокислых солей: двунатриевого и тринатриевого фосфата. Для приготовления раствора буфера при pH=10 поступают следующим образом.

Растворяют 103 г двунатриевого фосфата Na_2HPO_4 в дистиллированной воде и доводят объем раствора до 1.5 л. 12.7 г тринатриевого фосфата (Na_3PO_4) растворяют в воде и объем доводят до 1 л. Полученные растворы сливают вместе. Для получения буфера с другим pH можно менять соотношение объемов сливаемых растворов.

Посуда

Стеклянные фильтры производства «Дружная горка» имеют четыре номера. № 1 самый пористый, а № 4 самый плотный. Наиболее употребительными являются №№ 2 и 3. Перед употреблением фильтры следует тщательно промыть хромовой смесью, водой и тем растворителем, который служит для экстракции.

Лаборатория должна иметь набор делительных воронок емкостью от 200 мл до 4 л. Нужно следить за тем, чтобы краны и пробки делительных воронок были хорошо пришлифованы во избежание потерь при разделении пигментов.

Для фиксации материала при низких температурах необходимо иметь несколько сосудов Дьюара, желательно различной емкости — большие для хранения сухого льда и малые для приготовления охлаждающих смесей.

Аскорбат натрия

50 г аскорбиновой кислоты растворяют в 100 мл воды. К раствору прибавляют эквивалентное количество бикарбоната натрия. Полученный раствор охлаждают при 4—6°, затем небольшими порциями помещают в холодильник и оставляют его на холоду до полного выпадения осадка и просветления жидкости. Фильтрование также производят на холоду; для проверки полноты осаждения к фильтрату вторично добавляют небольшие количества спирта. Белый осадок высушивают и хранят в вакуум-эксикаторе.

Приготовление трис-HCl

Трис — это фабричное название тригидроксиметиламинометана. Для получения требуемого pH к 100 мл раствора триса (0.05 М) добавляют соответствующее количество 0.1 н. HCl.

0.1 н. HCl, мл	pH раствора
45	7.19
42.5	7.36
40	7.54
37.5	7.66
35	7.77
32.5	7.87
30	7.96
27.5	8.05
26	8.14
22.5	8.23
20	8.32

Получение растворимой натриевой соли АДФ

Навеску бариевой соли АДФ (0.052 г) растворяют в 2.5 мл 0.1 н. HCl. К раствору добавляют три капли насыщенного раствора Na_2SO_4. Осадок сернокислого бария удаляют центрифуги-

рованием. В растворе остается эквивалентное количество натриевой соли АДФ. Этот раствор и используется для приготовления реакционных смесей; его готовят каждый раз перед началом опыта, так как натриевая соль АДФ нестойка.

Очистка АДФ от примеси АМФ

Препараты АДФ, имеющиеся в продаже, часто содержат примесь АМФ (аденозинмонофосфат), являющейся менее активным акцептором неорганического фосфата в реакциях фосфорилирования, чем АДФ. В связи с этим необходимо произвести очистку препарата.

Для разделения АДФ и АМФ используют анионообменные смолы. Наиболее употребительны смолы Дауэкс-1 (импортная) и аниониты отечественного производства — ЭДЭ-10-П, АВ-16 и АВ-17. Наилучшие результаты получены со смолами АВ-17 и Дауэкс-1; смола АВ-17 обладает меньшей емкостью, чем Дауэкс-1. Смолы высушивают, измельчают на кофейной мельнице, просеивают через сито в 100 меш., отмучивают водой от мелких частиц, не оседающих в течение 5 мин. после размешивания, и переводят в колонке в Cl^--форму пропусканием 1 н. HCl с последующим отмыванием дистиллированной водой до pH=4—5. Для препаративных целей используют колонки высотой в 4—8 см с поперечным сечением 0.6—1.1 $см^2$. На такой колонке можно разделить не более 100—300 мг АДФ.

Для разделения на колонке раствор, содержащий 100—300 мг соли АДФ, нейтрализуют 1 н. NH_4OH до pH=6.8, доводят водой до объема 5—10 мл и вводят в колонку, медленно пропуская его через слой смолы.

Вытекающую жидкость собирают для определения полноты поглощения. Колонку промывают водой до тех пор, пока экстинкция при 260 ммк не упадет до нуля. При этом выделяется незначительная часть нуклеотидов (обычно менее 1% E_{260}).

Для элюции нуклеотидов колонку присоединяют стеклянной трубкой к резервуару, находящемуся на высоте 1 м над колонкой, для создания гидростатического давления. Во избежание гидролиза лабильных нуклеотидов пользуются слабой HCl (не выше 0.01 н.). Фракции объемом 10—15 мл собирают с помощью автоматического коллектора; скорость элюции составляет около 1 мл в мин. Элюируют АМФ, для этого через колонку пропускают около 200 мл раствора 0.005 н. HCl. Затем пропускают около 400 мл раствора 0.01 н. NaCl в 0.01 н. HCl, который элюирует АДФ. Фракцию раствора, содержащую АДФ, быстро нейтрализуют, затем сгущают в вакууме примерно в 10 раз и осаждают ацетатом бария в присутствии 50%-го этанола.

Смесь для фотофосфорилирования

Высокий уровень нециклического фотофосфорилирования получается при применении следующей реакционной смеси. На 3 мл реакционной смеси[1] флавинмононуклеотида должно приходиться 0.05 мкмоля, аскорбата натрия — 5.00, монофосфата калия — 10.00, аденозиндифосфата — 10.00, хлористого натрия — 0.35, хлористого магния — 5.00, трис-HCl (pH = 7.8) — 40.00 мкмоля.

Для получения требуемых концентраций каждого из перечисленных веществ готовят более концентрированные растворы (в 10 раз крепче). Хранить их следует на холоду и в темноте. Готовить требуемое количество смеси перед началом опыта рекомендуется таким образом, чтобы хлористый магний и трис приливать в последнюю очередь.

ОБРАБОТКА ПОЛУЧЕННЫХ ДАННЫХ

Как и при любом биохимическом исследовании, большое внимание при изучении пигментов следует уделять ведению протоколов. Само собой разумеется, что формы ведения протоколов могут варьировать в зависимости от характера опыта; мы можем лишь рекомендовать одно основное правило: все цифровые данные должны быть занесены в журнал, на одной странице которого регистрируют показания приборов, а на другой производят расчеты. Ни в коем случае нельзя прибегать к записям на случайных листах бумаги. Протоколы следует вести таким образом, чтобы даже через несколько лет после проведенного опыта можно было восстановить его результаты по записям в журнале.

Полученные в опытах данные неизбежно содержат погрешности, обусловленные самыми различными причинами. При этом следует различать погрешности систематические и случайные. Систематические ошибки обусловлены причинами определенными; они почти всегда могут быть устранены или достаточно точно учтены. Источниками такого рода ошибок могут быть неправильно отградуированный прибор или недостаточно хорошо откалиброванная пипетка и т. п.

Случайные ошибки вызываются большим числом отдельных причин, не поддающихся точному учету. Полностью исключить эти ошибки невозможно; учесть же их можно, но только в усредненном виде. Для этого нужно знать законы, которым подчиняются средние ошибки. Для подавляющего большинства случаев наиболее простым является так называемый нормальный закон распределения ошибок. Для характеристики нормального

---

[1] В каждую колбочку вносят по 2.7 мл смеси и добавляют по 0.3 мл суспензии хлоропластов.

закона распределения очень важным показателем является величина дисперсии, иначе называемая «вариансой» и обозначаемая символом σ^2.

Обозначим $\bar{x}$ — среднеарифметическую величину, x — отдельное измерение, а n — число измерений, Σ — знак суммы. Среднеарифметическая величина равняется сумме отдельных измерений (вариант), деленной на число вариант:

$$\bar{x}=\frac{\sum(x)}{n}.$$

Отклонения наблюдаемых значений от среднего арифметического обозначим через $x-\bar{x}$. Тогда величина дисперсии нормального закона распределения ошибок определяется следующей формулой:

$$\sigma^2=\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n-1}. \qquad (1)$$

Чем больше величина дисперсии, тем больше вероятность больших ошибок, и, наоборот, чем меньше величина дисперсии, тем меньше вероятность больших ошибок.

Кроме дисперсии, для характеристики нормального закона распределения применяется средняя квадратическая ошибка, обозначаемая буквой σ и равная корню квадратному из величины дисперсии, а также простая средняя ошибка η, вычисляемая по следующей формуле:

$$\eta=\frac{\sum(x-\bar{x})}{\sqrt{n(n-1)}}. \qquad (2)$$

Между средней квадратической ошибкой и простой средней ошибкой существует следующая зависимость:

$$\eta=\sqrt{\frac{2}{\pi}}\,\sigma, \text{ или } \sigma=\sqrt{\frac{\pi}{2}}\,\eta. \qquad (3)$$

Для того чтобы проверить, подчиняются ли данные, полученные в опыте, нормальному закону распределения, следует вычислить величину средней квадратической ошибки двумя способами: первый способ заключается в извлечении корня из величины дисперсии, найденной по формуле (1); второй способ основан на вычислении простой средней ошибки по формуле (2), после чего значение ее подставляют в формулу (3). Если имеется распределение по нормальному закону, то значения σ, вычисленные обоими способами, должны быть близкими.

Вышеприведенный прием математической обработки позволяет произвести оценку достоверности разности между среднеарифметическими ($\bar{x}_1$ и $\bar{x}_2$) двух серий данных, полученных экс-

периментальным путем, или, как говорят, двух выборок генеральной совокупности.

Для установления достоверности разницы между двумя средними арифметическими можно воспользоваться следующей формулой:

$$t = \frac{D}{S_d}, \qquad (4)$$

где D — разность значений среднеарифметических, а S_d — средняя ошибка разницы, вычисляемая по формуле

$$S_d = \sqrt{\frac{\sum (x_1 - \bar{x}_1)^2 + \sum (x_2 - \bar{x}_2)^2}{(n_1 - 1)(n_2 - 1)} \left(\frac{n_1 + n_2}{n_1 \cdot n_2} \right)}.$$

Величина t (4) определяет достоверность разницы между двумя среднеарифметическими. В общем случае можно пользоваться правилом «трех сигм» — если разница превышает свою ошибку в три раза, то она достоверна с вероятностью не менее 0.99. В этом случае уровень значимости равен 0.01. Это означает, что только в одном случае из ста эта разница может быть случайна.

Если величина $t > 3$, то уровень значимости равен 0.001, т. е. лишь в одном из тысячи случаев эта разница может быть случайной.

В биологических исследованиях можно смело пользоваться уровнями значимости, лежащими между 0.01 и 0.001.

ОГЛАВЛЕНИЕ

		Стр.
Глава I.	Пигменты пластид и значение их исследования	3
Глава II.	Классификация пигментов пластид	9
Глава III.	Строение и свойства пигментов пластид	11
Глава IV.	Свойства пигментов в живой пластиде	31
Глава V.	Распространение пигментов пластид	39
Глава VI.	Биосинтез пигментов пластид	43
Глава VII.	Подготовка материала к анализу	47
Глава VIII.	Экстракция пигментов	54
Глава IX.	Качественное разделение пигментов	57
Глава X.	Количественное определение пигментов	63
Глава XI.	Препаративное получение пигментов и их комплексов	75
Глава XII.	Описание отдельных методик	95
Приложение		113

ПИГМЕНТЫ ПЛАСТИД ЗЕЛЕНЫХ РАСТЕНИЙ И МЕТОДИКА ИХ ИССЛЕДОВАНИЯ

*Утверждено к печати
Ботаническим институтом им. В. Л. Комарова
Академии наук СССР*

Редактор Издательства *М. А. Белкина*
Художник *Д. С. Данилов*
Технический редактор *М. Н. Кондратьева*
Корректоры *Ш. А. Иванова, Н. З. Петрова*
и *Г. И. Яковлева*

Сдано в набор 23/I 1964 г. Подписано к печати 26/III 1964 г. РИСО АН СССР № 16—7В. Формат бумаги $60\times90^1/_{16}$. Бум. л. $3^7/_8$. Печ. л. $7^3/_4=7^3/_4$ усл. печ. л. + +1 вкл. Уч.-изд. л. 7,55+1 вкл. (0,03). Изд. № 2230. Тип. зак. № 584. М-24916. Тираж 2300. Т. П. 1964 г. № 986. *Цена 54 коп.*

Ленинградское отделение Издательства «Наука»
Ленинград, В-164, Менделеевская лин., д. 1

1-я тип. Издательства «Наука»
Ленинград, В-34, 9 линия, д. 12

ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА»

В магазинах конторы «АКАДЕМКНИГА»

имеются в продаже книги:

Бреславец Л. П. Полиплоидия в природе и опыте. 1963. 364 стр. Цена 2 р. 48 к.

Обстоятельно рассматривается одна из важнейших биологических проблем — проблема возникновения новых форм растений посредством полиплоидии.

Полиплоидия у растений. Труды Совещания по полиплоидии у растений 25—28 июня 1958 г. 1962. 376 стр. Цена 2 р. 28 к.

Физиологическое обоснование системы питания растений. 1964. 340 стр. Цена 1 р. 64 к.

Фотосинтез и вопросы продуктивности растений. 1963. 159 стр. Цена 1 р. 2 к.

В книге в основном оценивается фотосинтетическая продуктивность сельскохозяйственных растений в полевой культуре.

Чайлахян М. Х. Гиббереллины растений. Инструкция по испытанию и применению гиббереллинов на культурных растениях. 1963. 63 стр. Цена 22 к.

ГОТОВЯТСЯ К ПЕЧАТИ

Полиплоидия и селекция. 25 л. Цена 1 р. 95 к.

Освещаются вопросы распространения и селекции полиплоидных растений: злаковых, табаков, сахарной свеклы, плодовых деревьев и др. Ряд работ посвящен теоретическим вопросам, связанным с механизмом возникновения полиплоидных наборов хромосом в клетках.

Роль клеточных реакций в приспособлении многоклеточных организмов к температуре среды. 25 л. Цена 1 р. 90 к.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА»

ГОТОВЯТСЯ К ПЕЧАТИ

Рост, развитие и урожай растений. Труды Ботанического института им. В. Л. Комарова. Серия IV. Экспериментальная ботаника. Вып. 17. 10 л. Цена 70 к.

Сборник содержит работы в области физиологических основ продуктивности растений.

Эволюционная биохимия растений. 12 л. Цена 85 к.

Включены работы по вопросам азотистого обмена в семенах растений из семейств бобовых, злаковых и др.

Руководство по цитологии. Том 1. 50 л. Цена 3 р. 70 к.

Двухтомное «Руководство по цитологии» имеет целью дать критическую сводку современного состояния знаний о строении и физиологии клетки.

ВАШИ ЗАКАЗЫ НА КНИГИ ПРОСИМ НАПРАВЛЯТЬ ПО АДРЕСУ:

Москва, К-12, Б. Черкасский пер., 2/10.

Контора «Академкнига», отдел «Книга—почтой»

или в ближайший магазин «Академкнига»

Адреса магазинов «Академкнига»: **Москва,** ул. Горького, 6 (магазин № 1); 1-й Академический проезд, 55/5 (магазин № 2); **Ленинград,** Литейный пр., 57; **Свердловск,** ул. Белинского, 71в; **Новосибирск,** Красный пр., 51; **Киев,** ул. Ленина, 42; **Харьков,** Уфимский пер., 4/6; **Алма-Ата,** ул. Фурманова, 129; **Ташкент,** ул. Карла Маркса, 29; **Баку,** ул. Джапаридзе 13.

При получении заказа книги, как имеющиеся в наличии, так и печатающиеся (по поступлении в продажу), будут направлены в Ваш адрес наложенным платежом. Пересылка за счет заказчика.

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ЗАКАЗЫ НА КНИГИ ПРИНИМАЮТСЯ ТАКЖЕ МЕСТНЫМИ МАГАЗИНАМИ КНИГОТОРГОВ И ПОТРЕБИТЕЛЬСКОЙ КООПЕРАЦИИ.

54 коп.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА»